GRIGORE MIHĂESCU

CARMEN CHIFIRIUC

IONEL CIUGULEA

# TOXINE ȘI SUBSTANȚE POTENȚIAL TOXICE

EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE

Scanned with OKEN Scanner

615.9
612.017
- toxicologie
- toxine

GRIGORE MIHĂESCU

CARMEN CHIFIRIUC IONEL CIUGULEA

# TOXINE ŞI SUBSTANŢE POTENŢIAL TOXICE

Scanned with OKEN Scanner

Copyright © Editura Academiei Române, 2005.
Toate drepturile asupra acestei ediţii sunt rezervate editurii.

Adresa: EDITURA ACADEMIEI ROMÂNE
Calea 13 Septembrie, nr. 13, sector 5,
050711, Bucureşti, România
Tel. 40-21-318 81 46, 40-21-410 32 00
Fax. 40-21-410 39 83
E-mail: edacad@ear.ro
Internet: http://www.ear.ro

Redactor: med. vet. MARIANA-SIMONA GÂDEA
Tehnoredactor: ing. SOFIA MORAR
Coperta: GIGI GAVRILĂ

---

Bun de tipar: 21.03 2005. Format: 16/70×100.
Coli de tipar: 22,75.
C.Z. pentru biblioteci mari: 615.9; 612.017.4
C.Z. pentru biblioteci mici: 615

**ISBN: 973–27–1135–1**

---

Imprimat în România

Scanned with OKEN Scanner

# PREFAȚĂ

Sinteza toxinelor este o proprietate importantă a unui număr mare de microorganisme (bacterii, fungi microscopici, cianobacterii, microalge), a unor macrofungi, dar şi a unor organisme superioare, angiosperme şi vertebrate.

Pentru un număr mare de microorganisme patogene, sinteza toxinelor este unul dintre *factorii majori de virulență*, toxinele fiind adeseori mediatorii efectelor patologice care însoțesc procesul infecțios.

Din punct de vedere chimic, toxinele *bacteriene* sunt, de cele mai multe ori, de natură proteică. După secreția în situsul infecțios, toxinele induc sinteza anticorpilor specifici neutralizanți. Studiile de biologie moleculară relevă atât mecanismele secreției acestor molecule din celula producătoare, cât şi mecanismele de acțiune ale toxinelor asupra celulelor sensibile. Am urmărit să prezentăm, cu precădere, rolul fiziologic al toxinelor pentru microorganismele parazite, în relația lor cu organismele superioare, precum şi mecanismele acțiunii diferitelor substanțe toxice.

Cea mai mare diversitate de toxine este sintetizată de *fungii saprobionți* şi de *alge*. Ele par a fi numai metaboliți secundari, fără să aibă o semnificație fiziologică sau ecologică.

Toxinele secretate de *cianobacterii* şi *algele verzi* (dinoflagelate şi diatomee) sunt *molecule neproteice*, din categoria metaboliților secundari, care se acumulează în moluştele bivalve, ce se hrănesc prin filtrarea apei şi produc intoxicații la consumatorii de la capătul lanțului trofic (peşti, mamifere marine, om).

*Microfungii* secretă o diversitate considerabilă de toxine, din punct de vedere al structurii chimice şi al efectelor pe care le produc asupra organismului uman şi animal după ingestia alimentelor contaminate, cu cel mai mare impact asupra stării de sănătate a diferitelor comunități umane. Din numărul mare de toxine fungice, de ordinul sutelor, noi am prezentat grupele cele mai reprezentative: aflatoxine, trichotecene, ochratoxine, fumonisine, toxine alcaloidice cu nucleu indolic.

La nevertebrate capacitatea de a sintetiza toxine este limitată: un coral produce cea mai puternică toxină cunoscută – *palitoxina*, iar viespile, albinele şi scorpionii posedă glande care secretă amestecuri complexe de enzime şi toxine neurotoxice, ce poartă denumirea generică de *venin*, pe care le utilizează în special ca arme de apărare.

La *vertebrate* capacitatea de sinteză a toxinelor este foarte restrânsă. Glandele şerpilor veninoşi sintetizează un amestec complex de *hemotoxine* şi *neurotoxine*, prin intermediul cărora prada este neutralizată.

Scanned with OKEN Scanner

*Plantele superioare* sintetizează puține substanțe din categoria *toxinelor propriu-zise,* dar produc o diversitate impresionantă sub raportul structurii chimice, de *molecule cu potențial toxic* (alcaloizi, glicozide etc.).

*Ricinus communis* și *Abrus precatorius* produc toxine de natură proteică (ricina și abrina), cu un potențial toxic foarte înalt, care se acumulează în semințe. Câteva molecule de ricină sau de abrină omoară celula umană sau animală.

Din punct de vedere chimic, majoritatea substanțelor potențial toxice produse de plante sunt *alcaloizi* și *glicozizi*. Unele glicozide sunt medicamente cardiostimulatoare, de mare importanță farmacologică.

Stejarul otrăvitor și oțetarul otrăvitor produc substanțe din categoria *fenolilor*, care induc fenomene alergice de tipul hipersensibilității întârziate după contactul secundar cu epiteliul tegumentar.

Dintre sutele de substanțe toxice, cel mai înalt potențial toxic pare să-l aibă *palitoxina*, o toxină produsă de coralul moale *Palythoa toxica*, cu o structură chimică unică, datorită prezenței celor 129 atomi de C, dintre care 115 sunt legați covalent.

Lucrarea *Toxine și substanțe potențial toxice* și-a propus să reunească într-o concepție sintetică și unitară cele mai noi informații privind structura chimică a unui grup foarte heterogen de substanțe toxice și potențial toxice, sintetizate de organisme foarte diverse, mecanismul lor de acțiune asupra celulelor și organismelor sensibile, precum și riscurile privind starea de sănătate a organismului uman și animal. Este prima încercare din literatura biologică de a reuni într-un ansamblu conceptual unitar cunoștințele fundamentale referitoare la toxine.

Sinteza monografică răspunde unei cerințe de informare și de cunoaștere a unor aspecte teoretice, dar în special de ordin practic, cu privire la sursele naturale de toxine și la riscurile imediate sau potențiale pentru sănătatea organismului uman și animal.

Scanned with OKEN Scanner

# CUPRINS


**Introducere** ..... 11

*Capitolul I.* **TOXINE BACTERIENE** ..... 13

**Clasificarea toxinelor bacteriene** ..... 13
**Toxicitatea** ..... 15
**Determinismul genetic al sintezei toxinelor bacteriene** ..... 16
**Proteinele structurale ale membranei** ..... 17
**Sinteza exotoxinelor şi endotoxinelor bacteriene** ..... 22
**Mecanismele secreţiei proteinelor bacteriene** ..... 22
***Secreţia proteinelor la bacteriile Gram negative*** ..... 24
***Calea generală de export (Calea de tip I)*** ..... 25
*Calea de tip I Sec-dependentă* ..... 25
*Calea de tip I Sec-independentă* ..... 28
***Sisteme de secreţie dependente de calea generală de transport*** ..... 29
*Calea de secreţie de tip II* ..... 29
*Calea desecreţie de tip IV* ..... 30
***Sisteme de secreţie independente de calea generală de export*** ..... 32
*Secreţia prin transportorii ABC (ATP Binding Cassette)* ..... 32
*Sistemul de secreţie de tip III* ..... 33
***Exportul proteinelor la bacteriile Gram pozitive*** ..... 36
**Receptorii celulari pentru toxine** ..... 38
**Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă** ..... 39
**Mecanisme generale ale acţiunii toxinelor bacteriene** ..... 41
***Toxine cu activitate ADP-ribozilantă*** ..... 42
***Toxine care inactivează proteinele Rho prin alte mecanisme decât ADP-ribozilarea*** ..... 46
***Toxine proteolitice*** ..... 46
***Toxine formatoare de pori*** ..... 47
***Toxine termostabile care activează guanilat ciclaza*** ..... 51
**Exotoxine** ..... 52
***Toxine clostridiene*** ..... 53
*Tetanospasmina* ..... 55
*Tetanolizina* ..... 57
*Toxina botulinică* ..... 58
*Histotoxinele* ..... 62
***Exotoxina de Bacillus anthracis*** ..... 69
***Exotoxine secretate de Bacillus cereus*** ..... 71
***Proteinele incluziilor cristaline de la Bacillus thuringiensis*** ..... 71
***Exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa*** ..... 73
***Toxinele stafilococice*** ..... 75
*Superantigenele toxice pirogene* ..... 75


Scanned with OKEN Scanner

*Hemolizinele* ..... 76
*Exfoliatina* ..... 78
***Toxine streptococice*** ..... 79
*Streptrolizina O (SLO)* ..... 83
*Streptolizina S* ..... 85
*Streptokinoza* ..... 85
*Peptidaza* C5a ..... 86
***Enterotoxinele produse de Escherichia coli*** ..... 86
***Toxinele produse de Yersinia*** ..... 93
***Toxinele produse de Campylobacter*** ..... 94
***Toxina difterică*** ..... 95
***Toxinele produse de Bordetella pertussis*** ..... 98
***Toxina holerică şi toxinele accesorii produse de Vibrio cholerae*** ..... 102
***Toxinele produse de speciile de Aeromonas*** ..... 111
**Endotoxine** ..... 113
***Structura chimică a moleculei de LPS*** ..... 114
***Efectele endotoxinelor LPS*** ..... 115
*Efectul adjuvant* ..... 117
*Răspunsul imun anti-LPS* ..... 118
*Efecte toxice* ..... 120
***Rolul imunomodulator al altor antigene bacteriene*** ..... 123

*Capitolul II.* **TOXINE FUNGICE** ..... 127

**Importanţa practică a fungilor** ..... 127
**Tipuri de infecţii fungice** ..... 128
**Toxine produse de fungi microscopici (Micotoxine)** ..... 130
***Condiţiile sintezei micotoxinelor*** ..... 133
***Clasificarea micotoxinelor*** ..... 135
*Aflatoxine* ..... 135
*Trichotecene* ..... 144
*Ochratoxine* ..... 160
*Fumonisine* ..... 162
*Micotoxine tremogene* ..... 165
*Lactone nesaturate* ..... 170
*Toxine produse de fungi din genul Claviceps* ..... 173
**Determinarea prezenţei micotoxinelor în substratul contaminat** ..... 178
***Toxine fungice în clădirile umede*** ..... 179
**Interacţiunea micotoxinelor cu macromoleculele** ..... 185
**Toxine produse de macromicete** ..... 188
***Amatoxinele*** ..... 191
***Mecanismul acţiunii amatoxinelor*** ..... 194
***Falotoxinele*** ..... 196
***Toxine alcaloidice cu nucleu indolic*** ..... 199

*Capitolul III.* **TOXINE PRODUSE DE AGENTII PATOGENI AI PLANTELOR (FITOTOXINE)** ..... 201

***Toxine cu acţiune selectivă produse de bacterii fitopatogene*** ..... 203
***Toxine cu acţiune selectivă produse de fungi fitopatogeni*** ..... 209
***Mecanismul de acţiune al fitotoxinelor cu specificitate de gazdă*** ..... 214
***Toxine cu acţiune nespecifică (neselectivă)*** ..... 216

Scanned with OKEN Scanner

*Hemolizinele* ..... 76
*Exfoliatina* ..... 78
***Toxine streptococice*** ..... 79
*Streptrolizina O (SLO)* ..... 83
*Streptolizina S* ..... 85
*Streptokinoza* ..... 85
*Peptidaza* C5a ..... 86
***Enterotoxinele produse de Escherichia coli*** ..... 86
***Toxinele produse de Yersinia*** ..... 93
***Toxinele produse de Campylobacter*** ..... 94
***Toxina difterică*** ..... 95
***Toxinele produse de Bordetella pertussis*** ..... 98
***Toxina holerică şi toxinele accesorii produse de Vibrio cholerae*** ..... 102
***Toxinele produse de speciile de Aeromonas*** ..... 111
**Endotoxine** ..... 113
***Structura chimică a moleculei de LPS*** ..... 114
***Efectele endotoxinelor LPS*** ..... 115
*Efectul adjuvant* ..... 117
*Răspunsul imun anti-LPS* ..... 118
*Efecte toxice* ..... 120
***Rolul imunomodulator al altor antigene bacteriene*** ..... 123

*Capitolul II.* **TOXINE FUNGICE** ..... 127

**Importanţa practică a fungilor** ..... 127
**Tipuri de infecţii fungice** ..... 128
**Toxine produse de fungi microscopici (Micotoxine)** ..... 130
***Condiţiile sintezei micotoxinelor*** ..... 133
***Clasificarea micotoxinelor*** ..... 135
*Aflatoxine* ..... 135
*Trichotecene* ..... 144
*Ochratoxine* ..... 160
*Fumonisine* ..... 162
*Micotoxine tremogene* ..... 165
*Lactone nesaturate* ..... 170
*Toxine produse de fungi din genul Claviceps* ..... 173
**Determinarea prezenţei micotoxinelor în substratul contaminat** ..... 178
***Toxine fungice în clădirile umede*** ..... 179
**Interacţiunea micotoxinelor cu macromoleculele** ..... 185
**Toxine produse de macromicete** ..... 188
***Amatoxinele*** ..... 191
***Mecanismul acţiunii amatoxinelor*** ..... 194
***Falotoxinele*** ..... 196
***Toxine alcaloidice cu nucleu indolic*** ..... 199

*Capitolul III.* **TOXINE PRODUSE DE AGENTII PATOGENI AI PLANTELOR (FITOTOXINE)** ..... 201

***Toxine cu acţiune selectivă produse de bacterii fitopatogene*** ..... 203
***Toxine cu acţiune selectivă produse de fungi fitopatogeni*** ..... 209
***Mecanismul de acţiune al fitotoxinelor cu specificitate de gazdă*** ..... 214
***Toxine cu acţiune nespecifică (neselectivă)*** ..... 216

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul IV.* **TOXINE PRODUSE DE CIANOBACTERII ŞI DE ALGE** ..... 220

**„Înfloririle" produse de cianobacterii şi alge** ..... 220
**Toxine produse de cianobacterii** ..... 221
***Toxine alcaloidice*** ..... 222
*Anatoxinele* ..... 222
*Saxitoxinele* ..... 224
*Cilindrospermopsina* ..... 225
*Aplisiatoxinele* .....
***Peptide ciclice*** ..... 225
*Microcistinele* ..... 225
*Nodularina* ..... 228
**Algatoxine** ..... 228
***Alge producătoare de toxine*** ..... 229
***Structura chimică a algatoxinelor*** ..... 231
*Saxitoxinele* ..... 232
*Brevetoxinele* ..... 234
*Ciguatoxinele* ..... 235
*Maitotoxinele* ..... 237
*Acidul okadaic* ..... 239
*Acidul domoic* ..... 239
***Mecanismele acţiunii toxinelor algale*** ..... 240
***Tipuri de intoxicaţii produse de algatoxine*** ..... 241

Capitolul V. **TOXINE ŞI SUBSTANŢE POTENŢIAL TOXICE PRODUSE DE PLANTE** ..... 245

**Alcaloizii** ..... 247
***Alcaloizi cu nucleu piperidinic sau piridinic*** ..... 249
***Alcaloizi din grupa tropanului*** ..... 253
***Alcaloizi cu nucleu izochinolinic*** ..... 259
***Alcaloizi indolici*** ..... 261
***Alcaloizi fără atomi de N heterociclici*** ..... 262
***Alcaloizi indolici cu structură heptaciclică*** ..... 264
***Alcaloizi cu nucleu imidazolic*** ..... 266
***Alcaloizi cu nucleu pirolizidinic*** ..... 266
***Alcaloizi cu nucleu chinolizidinic*** ..... 267
***Alcaloizi steroidici*** ..... 267
***Colchicina*** ..... 270
***Vinblastina*** ..... 272
***Vincristina*** ..... 272
***Taxina*** ..... 273
***Curara*** ..... 274
***Swainsonina*** ..... 276
***Alcaloizi purinici*** ..... 277
**Lectine toxice** ..... 278
*Ricina* ..... 283
***Aplicaţii practice ale ricinei*** ..... 283
*Abrina* ..... 284
**Alte molecule potenţial toxice din seminţele de leguminoase** ..... 284
**Glicozide toxice** ..... 288
***Glicozide cianogene*** ..... 289

Scanned with OKEN Scanner

*Nitroglicozide* ..... 293
*Glicozide cardiotonice* ..... 295
*Esculina* ..... 302
*Ranunculina* ..... 302
*Glucozinolaţi* ..... 303
*Graianotoxina* ..... 304
*Mezereina* ..... 306
*Ptaquilozida* ..... 307
**Toxicitatea mediată de oxalatul de calciu** ..... 307
**Compuşi fenolici cu potenţial toxic** ..... 309
*Cumarina* ..... 309
*Flavonoidele* ..... 312
*Taninurile* ..... 314
*Acidul galic* ..... 314
*Acidul tanic* ..... 315
*Pirogalolul* ..... 316
*Quercitina* ..... 317
*Quinonele* ..... 318
*Tetrahidrocanabinolul (HTC)* ..... 318
*Salicina* ..... 320
**Substanţe iritante care produc leziuni tegumentare** ..... 323
*Urushiol* ..... 324
*Amestecul iritant din Urtica* ..... 327
**Substanţe fotosensibilizante** ..... 328
*Hipericina* ..... 331
**Semnificaţia ecologică a toxinelor şi a substanţelor potenţial toxice produse de plante** ..... 332

*Capitolul VI.* **TOXINE PRODUSE DE NEVERTEBRATE** ..... 334

*Palitoxina* ..... 334
*Toxina onchidal* ..... 338
*Tetramina* ..... 338
*Conotoxina* ..... 338
*Veninul de albine* ..... 341
*Veninul de viespe* ..... 343
*Veninul de scorpion* ..... 343

*Capitolul VII.* **TOXINE PRODUSE DE VERTEBRATE** ..... 346

*Tetrodotoxina* ..... 346
*Batrachotoxinele* ..... 348
*Componentele veninului de şarpe* ..... 350
*Fosfolipaza $A_2$* ..... 352
*Componente neenzimatice ale veninului* ..... 355
*Mecanismul de acţiune al neurotoxinelor* ..... 356
*Dintele veninos* ..... 358
*Ofitoxemia* ..... 358
*Utilizări farmacologice ale veninului de şarpe* ..... 360

**Bibliografie selectivă** ..... 363

Scanned with OKEN Scanner

# INTRODUCERE

***Toxigenitatea*** sau toxigeneza este proprietatea unui organism de a elabora una sau mai multe substanţe toxice. Sinteza toxinelor sau a unor substanţe cu potenţial toxic este larg răspândită la grupe de organisme cu poziţie sistematică foarte diversă. Toxicitatea multor substanţe de origine biologică este foarte înaltă, adesea comparabilă cu a agenţilor chimici.

Toxinele produse de un agent patogen sunt substanţe chimice care determină parţial sau total simptomele maladiei. Sub denumirea de *toxină* sunt cuprinse toate substanţele toxice de proveniență biologică (sintetizate de bacterii, fungi, celule vegetale sau animale). Termenul de „toxină" derivă din cuvântul grecesc „toxicon", care înseamnă *otravă** şi a fost folosit pentru prima dată, de către Roux şi Yersin (1888), pe care au considerat-o „un fel de enzimă".

* Termenul de „otravă" cuprinde substanţele chimice organice sau anorganice (stricnina, săruri de Hg, As etc.), care introduse în organism pe cale orală sau parenterală produc leziuni celulare sau tisulare, perturbarea sau întreruperea unor activităţi fiziologice normale şi, în funcţie de doză, chiar moartea organismului.

Toxinele pot fi clasificate după *structura chimică* sau după *efectele farmacologice*: neurotoxine, miotoxine, hepatotoxine, nefrotoxine, toxine hematologice şi toxine cu acţiune locală.

În tabelul de mai jos sunt redate cele mai reprezentative organisme producătoare şi denumirile toxinelor pe care le sintetizează:

| **Organismul producător** | |
|---|---|
| I. *Proteine bacteriene* | *Denumirea toxinei* |
| *Bacillus anthracis* | Factorul letal |
| *Bacillus cereus* | Cereolizina |
| *Bordetella pertussis* | Pertusigen |
| *Clostridium botulinum tip* A | Neurotoxina |
| *Clostridium perfringens* | α-toxina, lecitinaza |
| *Clostridium tetani* | Tetanospasmina |
| *Corynebacterium diphteriae* | Toxina difterică |
| *Escherichia coli* | Enterotoxina termolabilă |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Toxina A |
| *Shigella dysenteriae* | Neurotoxina |
| *Staphylococcus aureus* | α-toxina |
| *Streptococcus pyogenes* | Toxinele piogene, eritrogene |
| *Vibrio cholerae* | Toxina cholerică |

Scanned with OKEN Scanner

## II. *Proteine vegetale*

| | |
|---|---|
| *Abrus precatorius* (seminţe) | Abrina |
| *Ricinus communis* (seminţe) | Ricina |

## III. *Substanţe toxice neproteice din plante*

| | |
|---|---|
| | Alcaloizi |
| | Glicozizi |

## IV. *Proteine animale*

| | |
|---|---|
| *Neurotoxine presinaptice* | |
| *Oxyuranus scutellatus* | Taipoxina |
| *Bungarus multicinctus* | β-bungarotoxina (fosfolipază) |
| *Crotalus* | Crotoxina (fosfolipază) |
| *Notechia scutalus* | Notexina (fosfolipază) |
| *Naja hage* | Neurotoxine postsinaptice |
| *Bungarus caeruleus* | Neurotoxina |
| Scorpion | Caeruleotoxina |
| Cnidaria | Diferite neurotoxine |
| *Toxine letale* | Toxine de nematocist |
| Tetraodontidae (peştele glob - *Fugu rubripes*) | Tetrodotoxina |

## V. *Neurotoxine* neproteice*

| | |
|---|---|
| *Anabaena flos-aquae* | Anatoxinele |
| | Saxitoxine |
| | Brevetoxine |
| Dinoflagelate | Ciguatoxina |
| Phyllobate | Batrachotoxina |
| *Palythoa toxica* (soft coral) | Palitoxina |
| *Actinaria* (anemona de mare) | Polipeptide neurotoxice |

* Neurotoxinele sunt un grup de toxine, heterogen din punct de vedere structural, care produc efecte foarte specifice asupra sistemului nervos al animalelor şi al omului, ce derivă din interferenţa cu propagarea impulsului nervos.

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul I*

# TOXINE BACTERIENE

Bacteriile patogene sintetizează o mare varietate de substanţe care, direct sau indirect, sunt toxice pentru celulele şi ţesuturile gazdei. Unele sunt secretate de celulele bacteriene în cantităţi foarte mici, fiind proteine cu acţiune predominant *enzimatică* şi poartă denumirea generică de *exotoxine*. Altele, de natură lipo-polizaharidică (LPS), care nu au acţiune enzimatică şi sunt biologic active la concentraţii mult mai mari, aparţin *endotoxinelor*. Se cunosc circa 140 de toxine proteice, din care 2/3 sunt produse de bacteriile Gram pozitive. Unele specii bacteriene produc între 5 şi l0 tipuri de toxine.

Capacitatea de a elabora toxine nu este însă limitată la bacteriile patogene propriu-zise. Numeroase saprobacterii produc substanţe toxice, uneori foarte puternice (de exemplu, toxina botulinică produsă de *Clostridium botulinum*). Toxigenitatea bacteriană variază în cadrul aceleiaşi specii şi este dependentă de condiţiile de mediu.

## Clasificarea toxinelor bacteriene

Pentru a-şi exercita efectul, toxinele trebuie să se elibereze din celule şi să se solubilizeze în umorile organismului. După sinteză, toxinele pot rămâne asociate permanent sau temporar cu celula secretoare sau sunt eliminate la exterior. Aceste diferenţe sunt dependente, în primul rând de specia producătoare, precum şi de fazele succesive ale evoluţiei unei populaţii bacteriene: faza exponenţială, staţionară sau de declin. Toxinele care în faza exponenţială a culturii bacteriene sunt asociate celulei, în faza de declin se găsesc libere în mediul extracelular datorită lizei celulelor. Din această cauză, studiul raportului topologic între celulă şi toxină are semnificaţie numai pentru faza de evoluţie a culturii bacteriene. Din acest punct de vedere, se disting următoarele categorii de toxine:

a) *toxine localizate în celulă* (citoplasmatice) produse de bacterii Gram negative (*Shigella dysenteriae, Yersinia pestis, Bordetella pertussis, Escherichia coli* etc.) şi Gram pozitive (enterotoxina produsă de *Clostridium perfringens*, streptolizina S, pneumolizina produsă de *Streptococcus pneumoniae*, o toxină sintetizată de *Clostridium difficile*). Toate sunt de natură proteică. Sunt localizate în citoplasmă sau sunt asociate membranei citoplasmatice şi pot fi eliberate după îndepărtarea peretelui prin liză mecanică sau prin extracţie chimică;

Scanned with OKEN Scanner

b) *toxinele constitutive ale peretelui celular*, produse numai de bacteriile Gram negative şi care corespund *endotoxinelor* clasice. Sunt situate în afara membranei citoplasmatice şi fac parte din structura membranei externe a peretelui celular. Din punct de vedere chimic, endotoxinele sunt complexe glicolipidice sau glicolipoproteice. Ele nu sunt niciodată eliberate în cursul fazei de creştere exponenţială, ci numai prin dezagregarea peretelui celular;

c) *toxinele eliminate* în mediul extern sau *exotoxinele* propriu-zise sunt de natură proteică şi sunt produse frecvent de bacteriile Gram pozitive (toxina difterică, toxinele stafilococice, toxina de *Bacillus anthracis* etc.), dar şi de cele Gram negative (*Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa*). Exotoxinele îndeplinesc în mod obligatoriu, trei condiţii:
   - se găsesc în mediul de creştere, independente de celula care le-a produs;
   - eliberarea lor în mediul extracelular nu necesită autoliza celulei care le secretă, celula rămânând viabilă, continuă să crească şi să se multiplice;
   - nu se acumulează în celulă.

Aceste criterii se aplică celulelor în faza de creştere exponenţială şi staţionară, deoarece, în faza de declin, celulele pot prezenta fenomene de autoliză, independente de sinteza toxinei.

d) *toxinele cu localizare mixtă* (endocelulară şi exocelulară), în funcţie de faza de evoluţie a culturii bacteriene. În faza exponenţială, toxinele sunt secretate parţial în mediu, dar o fracţie semnificativă rămâne în interiorul celulei şi este eliberată prin autoliză (toxina tetanică, botulinică).

Mult timp s-a considerat că exotoxinele sunt de natură proteică, iar endotoxinele – de natură lipopolizaharidică. Această diferenţiere nu este netă, deoarece unele toxine proteice aparţin categoriei endotoxinelor, fiindcă rămân asociate celulei producătoare şi invers, uneori, toxinele de natură lipopolizaharidică sunt eliminate la exterior ca exotoxine. De aceea, o clasificare mai adecvată a toxinelor se face după criteriul compoziţiei chimice. Din acest punct de vedere, majoritatea sunt de natură proteică, iar majoritatea endotoxinelor sunt de natură lipopolizaharidică.

Raynaud şi Alouf (1970) au clasificat toxinele în raport cu compoziţia chimică şi cu localizarea celulară în patru grupe:

*Grupa I* cuprinde toxinele proteice intracitoplasmatice ale bacteriilor Gram negative, eliberate după ruperea mecanică, enzimatică, prin autoliza învelişurilor sau prin extracţie chimică. Sunt sintetizate de *Bordetella pertussis, Shigella dysenteriae* (neurotoxina), *Yersinia pestis*.

*Grupa a II-a* cuprinde toxinele lipopolizaharidice sau glico-lipo-peptidice (endotoxine), componente structurale ale peretelui celular Gram negativ. Cele mai tipice endotoxine se găsesc la enterobacterii.

*Grupa a III-a* cuprinde exotoxinele proteice propriu-zise, produse de *Vibrio cholerae, Clostridium tetani, Corynebacterium diphteriae*.

*Grupa a IV-a* cuprinde toxinele proteice cu localizare intra- şi extracelulară, în cursul fazei logaritmice de creştere: toxinele produse de *Clostridium tetani, Clostridium botulinum, Clostridium oedematiens, Clostridium sordelii*.

Scanned with OKEN Scanner

Din punct de vedere exclusiv al compoziției chimice, se disting:

1) *toxine proteice*, reprezentate de exotoxinele produse de bacteriile Gram pozitive și de toxinele proteice intracelulare ale unor bacterii Gram negative: *Bordetella pertussis, Yersinia pestis, Shigella dysenteriae* (neurotoxina);

2) *toxinele glico-lipo-polipeptidice*, corespunzătoare endotoxinelor.

În raport cu *tropismul* lor se disting *neurotoxine, enterotoxine, cardiotoxine*, cu efecte limitate la țesutul respectiv sau toxine *pantrope*, cu efecte asupra mai multor categorii de țesuturi.

*Terminologie. Pretoxina* semnifică un precursor al toxinei, adică forma ei inactivă (omologă tripsinogenului sau pepsinogenului). Molecula inactivă poate deveni toxică, prin diferite procese, cel mai adesea sub acțiunea unei enzime, care clivează o secvență determinată de aminoacizi.

*Activarea* este un proces care determină modificări ale moleculei de toxină, ce constau în dobândirea proprietății toxice sau în creșterea toxicității. Procesul poate fi calitativ și semnifică producerea unei toxine active dintr-o pretoxină sau este cantitativ și semnifică creșterea nivelului toxicității preexistente.

*Toxinele simple* sunt cele alcătuite exclusiv dintr-o secvență de aminoacizi. Pot exista ca monomere, dimere sau polimere, dar agregatul toxic constă din subunități identice, cu toxicitate egală, iar efectul toxic cantitativ este aditiv.

*Toxinele complexe* sunt formate din două sau mai multe componente diferite. Devin funcționale (toxice) numai după ce componentele lor au fost reunite prin legături chimice corespunzătoare. Componentele individuale sunt mai puțin toxice decât complexul.

*Amestecul toxic* este un produs a cărui calitate toxică este determinată de mai multe componente, fiecare păstrându-și identitatea, fără să formeze complexe chimice. Fiecare component are o funcție unică și poate acționa independent asupra țesuturilor gazdei. Pot acționa asupra aceluiași țesut sau asupra unor țesuturi diferite. Toxicitatea globală a amestecului este dată de suma activităților individuale ale componentelor. De exemplu, toxina de *Bacillus anthracis* conține trei componente cu acțiune sinergică: factorul I (fără acțiune toxică *per se*) produce edemul tegumentar la iepure. În asociație cu factorul II, omoară șoarecele. Factorul III, neletal *per se* sau în amestec cu factorul II, mărește letalitatea amestecului I și II.

## Toxicitatea

Unele toxine au un efect toxic foarte puternic. De exemplu, toxina botulinică de tip D este de trei milioane de ori mai puternică decât stricnina, luată ca etalon, iar toxina tetanică, neurotoxina de *Shigella dysenteriae* și cea botulinică de tip A sau B, de un milion de ori.

Efectul toxic este variabil nu numai în funcție de specia bacteriană producătoare, ci și de tulpină, chiar în condițiile unui mediu optim. Adeseori, toxigeneza se atenuează sau chiar dispare, în subculturi repetate.

Scanned with OKEN Scanner

Efectul toxinelor este variabil în funcţie de natura, vârsta, greutatea, sexul, linia genetică a animalelor pe care sunt testate, ca şi de calea de administrare a toxinei.

Toxicitatea diferitelor probe ale aceleiaşi toxine poate prezenta variaţii foarte importante: de exemplu, unele probe de toxină botulinică sunt de 6000 de ori mai toxice pentru cobai, decât pentru şoarece, iar altele numai de trei ori.

Exotoxinele au, uneori, un rol determinant în patogeneza unor agenţi infecţioşi, datorită potenţialului lor toxic foarte înalt. De exemplu, toxinele purificate reproduc în general, manifestările clinice ale infecţiei cu *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetani* sau *Corynebacterium diphteriae*. Dar, la majoritatea agenţilor patogeni, exotoxinele acţionează sinergic cu alte componente celulare pentru a produce efectele potenţiale asupra gazdei. Sinteza şi secreţia toxinelor este reglată de alţi factori de virulenţă. De exemplu, capacitatea de aderenţă creează un contact strâns între agentul patogen şi celula sensibilă, ceea ce permite transferul toxinei şi exprimarea întregului potenţial toxic. Deşi toxina holerică poate reproduce multe dintre simptomele procesului infecţios, pentru exprimarea integrală a virulenţei bacteriene este necesară *adezina* care leagă celula bacteriană de celula mucoasei intestinale. Alteori, toxina are alte funcţii suplimentare celei de toxicitate, care amplifică virulenţa: toxina de *Bordetella pertussis* are şi rolul de proteină de aderenţă a bacteriei, la celulele mamaliene.

## Determinismul genetic al sintezei toxinelor bacteriene

Sinteza toxinelor bacteriene este codificată de gena denumită generic *tox*, a cărei localizare poate fi cromosomală, plasmidială sau fagică. La *Vibrio cholerae*, subunităţile toxinei holerice sunt codificate de gene cromosomale situate pe o insulă de patogenitate integrată în genomul celulei bacteriene prin intermediul fagului filamentos *ctx*, asociate cu gene ce codifică pentru alţi factori de virulenţă. Secvenţa *insulelor de patogenitate* diferă mult de a altor gene cromosomale, ceea ce denotă că ele sunt achiziţii relativ recente în evoluţie.

Recent, la tulpinile epidemiogene de *Vibrio cholerae* O1 si O139 s-au descris 2 factori majori de patogenitate şi anume: toxina holerică (CT) codificată de genele ctxAB şi pilul coreglat de toxină; genele ctx sunt situate pe un fag CTX care prin transfer orizontal, ajungând într-o celulă bacteriană de *Vibrio cholerae* se integrează prin intermediul promotorului în insula de patogenitate VPI 1 (fag filamentos VPIphi); VPI1 are 41,2 kb şi codifică 29 proteine dintre care majoritatea cu funcţii necunoscute. Fagul CTX poartă gena TCP, iar prin activarea promotorului acestei gene situate în amonte de gena ctx AB, genele ctxA şi B sunt activate şi determină sinteza de CT. Gena TCP determină sinteza pilinei şi asamblarea pililor, coreglată de toxină care este un factor esenţial de colonizare intestinală. Pilul este codificat, de asemenea, de un fag filamentos numit VPI 2, care are toate caracteristicile unei insule de patogenitate. VPI 2 are 57,3 kb şi

Scanned with OKEN Scanner

codifică neuraminidaza. Tulpinile de *Vibrio cholerae* non O1 şi non139 au potenţial patogen, deoarece posedă profagi CTXphi, deci şi gene ctx AB, dar sunt nonepidemiogene, datorită prezenţei unui represor în stare activă, care împiedică activarea promotorului fagic şi deci sinteza CT. Diferenţele între numărul de copii ale fagului CTX *per* celulă bacteriană, cât şi poziţia acestui fag în genomul tulpinilor de *Vibrio cholerae* influenţează producerea de CT.

La *Clostridium botulinum*, gena *tox*, cu situs cromosomal, prezintă mai multe alele, care codifică sinteza a 7 serotipuri de toxină (notate de la A la G), care nu dau reacţie încrucişată semnificativă cu anticorpii obţinuţi faţă de una dintre ele.

Enterotoxinele şi hemolizinele de *Escherichia coli*, toxina dermo-exfoliativă stafilococică sunt codificate de gene plasmidiale.

Gena *tox*, codificatoare a toxinei difterice este localizată în genomul unor bacteriofagi ADN (β, P, 1, W). Activitatea ei este controlată de o genă situată pe cromosomul bacterian.

Fagii purtători ai genei *tox* se găsesc în celulele de *Corynebacterium diphteriae* în stare integrată (profag), de fag virulent replicativ sau sub forma de replicon autonom represat. Este cunoscut modul de funcţionare a genei *tox*, purtată de fagul β, ce se integrează ca profag. Gena *tox* se găseşte aproape de situsul de inserţie a genomului fagic în cromosomul bacterian, dar are propriul sau promotor şi se poate exprima independent de alte gene fagice, dar poate fi represată fără să influenţeze biosinteza altor proteine fagice. Această genă nu pare a fi esenţială pentru genomul fagic. Modificarea ei mutaţională nu afectează ciclul de replicare a fagului. Se consideră că gena *tox* a acestui fag este de origine bacteriană, care a fost mobilizată prin procesul de transducţie fagică.

Sinteza toxinei eritrogene streptococice (scarlatinoasă), precum şi a toxinelor botulinice C şi D este codificată de fagi temperaţi. La *Clostridium perfringens*, toxigeneza este legată temporal de procesul sporulării. Sporularea este o condiţie obligatorie, dar insuficientă pentru producerea toxinei. Toxina pare a fi un produs al unei gene de sporulare şi este o proteină de structură a tunicii sporale.

### Proteinele structurale ale membranei

Pentru a-şi exercita efectul, toxinele trebuie să se elibereze din celule şi să se solubilizeze în umorile organismului. După sinteză, toxinele pot rămâne asociate permanent sau temporar cu celula sau sunt eliminate la exterior. Aceste diferenţe sunt dependente, în primul rând de specia producătoare, precum şi de fazele succesive ale evoluţiei unei populaţii bacteriene: faza exponenţială, staţionară sau de declin.

Majoritatea toxinelor de natură proteică sunt *exotoxine*. Ele sunt sintetizate şi eliberate numai de celulele care cresc, aflate în faza logaritmică şi de încetinire a ritmului de creştere. Exotoxinele apar în mediul extracelular imediat după debutul sintezei, sau după o anumită perioadă, dar concentraţia lor în mediul extracelular nu creşte semnificativ în faza staţionară sau cea de declin.

inv. 157742

Scanned with OKEN Scanner

Sinteza lor pare să se facă după un mecanism comun cu sinteza enzimelor extracelulare: ambele tipuri de molecule se sintetizează pe ribosomii ce tapetează faţa internă a membranei citoplasmatice.

Pentru a înţelege mecanismele secreţiei exoproteinelor este necesară o scurtă prezentare a proteinelor structurale ale membranei.

În raport cu dispunerea lor în structura membranei, proteinele sunt *periferice* şi *integrate*.

Proteinele *periferice* sunt asociate cu membrana, dar nu au nici o secvenţă inclusă în structura ei. Clasa proteinelor periferice este împărţită în două subclase:

- *proteinele asociate membranei* sunt globulare, legate pe suprafaţa membranei, fie de stratul lipidic, fie de proteinele integrate;
- *proteinele membranare de schelet* sunt localizate imediat sub membrana plasmatică. Ele se asociază componentelor membranei, iar în celula eucariotă se leagă şi cu citoscheletul. La procariote se acceptă existenţa unui citoschelet primitiv, format din EF-Tu (*E*longation *F*actor *T*ermo-*u*nstable) şi FtsZ (*F*actorul *t*ermo-*s*tabil), cu rol de suport al structurii celulare, lipsind însă structurile de tipul microfilamentelor şi microtubulilor. FtsZ are potenţial de polimerizare şi are funcţia de reţea celulară de suport. Echivalentul lui EF-Tu din celula eucariotă este EF1a.

Clasa proteinelor membranare *integrate* prezintă cel puţin un domeniu al moleculei situat în regiunea hidrofobă a stratului lipidic. Ele pot fi dislocate din structura membranei numai în prezenţa detergenţilor ce solubilizează lipidele. Proteinele integrate difuzează liber în planul lateral al matricei lipidice, dar nu trec liber dintr-un strat în altul şi de aceea asimetria funcţională a membranei se păstrează pentru perioade lungi.

Clasa proteinelor integrate se împarte în două subclase:

- *proteinele transmembranare,* care au o mare parte a masei lor inclusă în dublul strat fosfolipidic, dar expun domenii semnificativ diferite pe ambele feţe ale membranei, ceea ce conferă asimetria funcţională a acesteia;
- *proteinele membranare ancorate,* care au un domeniu ce penetrează stratul lipidic, dar nu traversează complet membrana. Sunt ancorate de membrană prin legătură covalentă cu lipidele.

Proteinele membranare periferice au o structură analogă proteinelor hidrosolubile. Cele integrate au o structură diferită, deoarece, cel puţin un domeniu al moleculei este inclus în mediul hidrofob al lipidelor şi trebuie să fie compatibil cu acesta. Secvenţa de aminoacizi a domeniului inclus în stratul lipidic este hidrofobă, are configuraţia de α-helix şi cuprinde 19–23 aminoacizi.

Domeniul extralipidic al proteinelor integrate este hidrofil, ceea ce conferă *asimetria structurală* şi *funcţională* a membranei, permeabilitatea feţei interne fiind superioară celei a feţei externe.

Asimetria structurală a proteinelor integrate se evidenţiază pe imagini eletrono-optice ale membranei criofracturate. Tehnica criofracturării presupune îngheţarea rapidă a membranei la temperatura azotului lichid şi fracturarea

Scanned with OKEN Scanner

membranei cu un cuţit special. Membrana se clivează de-a lungul regiunii hidrofobe a acizilor graşi şi rezultă două jumătăţi de membrană, care prezintă un grad accentuat de asimetrie, conferită de proteinele transmembranare.

Proteinele membranare integrate prezintă o diversitate de stări topologice, adică de raporturi cu dublul strat lipidic, fiind: *monotopice, bitopice* şi *politopice*.

Proteinele *monotopice* sunt doar parţial incluse în stratul lipidic. Sunt asociate periferic cu membrana prin ancore localizate la una din extremităţi sau în interiorul secvenţei catenei polipeptidice.

Proteinele membranare *monotopice* sunt :

- *proteine membranare periferice* – sunt ancorate pe faţa citoplasmatică a membranei. Se consideră că cel puţin parţial sunt incluse în dublul strat fosfo-lipidic, dar legătura lor cu membrana este consolidată prin interacţiunea cu alte proteine membranare integrate (componente ale sistemelor de translocaţie, permeaze etc.). Nu au regiuni hidrofobe asemănătoare secvenţei semnal şi asocierea lor cu membrana este probabil spontană, însoţită de schimbări conformaţionale, induse, de exemplu, de legarea nucleotidelor;
- *proteine cu ancore helicale amfipatice* – sunt proteine secretorii eliberate în periplasmă care se pot reasocia cu membrana dacă au ancore N- sau C-terminale care să penetreze membrana;
- *lipoproteine* sunt cele mai abundente proteine bacteriene modificate post-traducere. Ele au un diacil-glicerid legat de S şi un grup monoacil legat de gruparea $NH_2$ a cisteinei care devine restul N-terminal după clivarea peptidului semnal de către o *l*ipoprotein-*s*emnal-*p*eptidază A (LspA). La bacteriile Gram pozitive sunt încorporate în lama externă a membranei citoplasmatice, unde au rolul de ancore pentru permeazele membranare.

La bacteriile Gram negative, lipoproteinele par să se insere cu aceeaşi probabilitate, în oricare dintre cele trei situsuri (lama externă a membranei interne şi cele două lame ale membranei externe).

Lipoproteinele se eliberează spontan din membrane, după liza celulelor, pentru că acizii graşi sunt ancore relativ labile. Unele lipoproteine au domenii care interacţionează cu molecule din alte structuri ale suprafeţei celulare. Pot avea puncte multiple de ancorare: se pot ancora într-o membrană prin acizii graşi, iar în alta printr-o secvenţă de aminoacizi hidrofobi.

Transportul lipoproteinelor din membrana citoplasmatică în membrana externă pune cele mai multe probleme mecanice:

- acizii graşi ai lipoproteinelor pot să rămână incluşi în lipidele membranare;
- pot să formeze micele lipoproteice în spaţiul periplasmic;
- lipoproteinele pot fi protejate de mediul apos din spaţiul periplasmic, de proteine cu rol de purtători.

Existenţa situsurilor membranare de contact care să permită transferul intermembranar al acidului gras este mai mult contestată decât argumentată. Un argument împotriva existenţei sale este absenţa porilor, care să permită contactul membranar direct sau al micelelor lipoproteice mari.

Scanned with OKEN Scanner

*Proteinele bi-* şi *politopice* au cel puţin o secvenţă de aminoacizi hidrofobi inclusă în stratul dublu lipidic, iar extremităţile sunt expuse pe ambele feţe ale membranei (fig. 1).

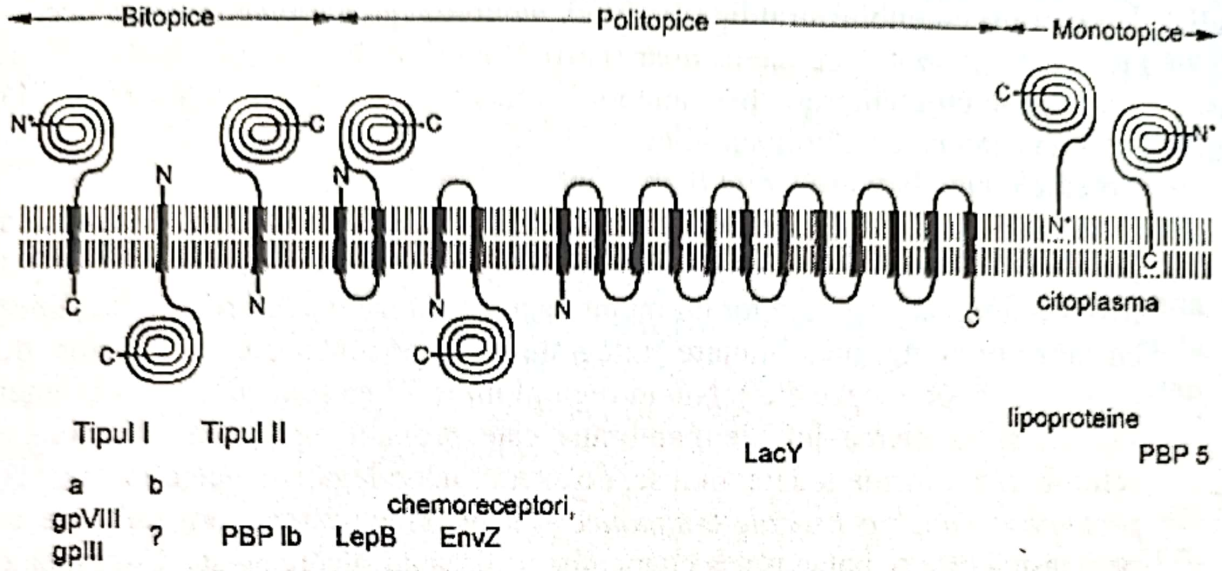



Fig. 1 – Exemple de topologii adoptate de proteinele membranei citoplasmatice. Proteinele *bitopice* au un singur segment hidrofob transmembranar (linia groasă), cele *politopice* au cel puţin două secvenţe hidrofobe ce traversează membrana de cel puţin două ori, iar cele *monotopice* sunt asociate cu membrana prin secvenţe de ancorare localizate la una dintre extremităţi (după Pugsley, 1993).

Proteinele membranare *bitopice* au un singur segment hidrofob, care poate străbate membrana în oricare din cele două orientări, în funcţie de polaritatea inserţiei iniţiale. Segmentul hidrofob nu este localizat în mod necesar la una din extremităţile proteinei.

Proteinele membranare *politopice* străbat membrana de cel puţin două ori şi de obicei nu sunt prelucrate de semnal-peptidază.

Segmentele transmembranare ale proteinelor bi- şi politopice se aseamănă cu secvenţele semnal: au lungimea de minim 12 resturi de aminoacizi şi sunt hidrofobe.

Proteinele membranare bitopice sunt de 3 tipuri:

- cele de tip Ia şi Ib au capătul C-terminal în citoplasmă;
- cele de tip II au capătul C-terminal în spaţiul periplasmic.

Proteinele membranare *bitopice de tip Ia* se sintetizează ca preproteine cu secvenţă semnal, ulterior clivat de o semnal-peptidază de tip LepB. O a II-a secvenţă hidrofobă stopează transferul şi o ancorează în membrană.

Proteinele membranare *bitopice de tip Ib* au o secvenţă unică de aminoacizi hidrofobi, neclivată, cu rol de secvenţă de inserţie în membrană, la capătul N-terminal. Acesta se inseră şi rămâne inclus în dublul strat lipidic în orientarea iniţială.

Proteinele *membranare de tip II* sunt asemănătoare proteinelor periplasmice, cu excepţia faptului că secvenţa semnal nu este clivată şi devine secvenţa de

Scanned with OKEN Scanner

ancorare în membrană. Absența clivării se datorează probabil absenței sau poziției neadecvate a secvențelor de recunoaștere pentru LepB. Proteinele de tip II diferă de cele de tip I numai prin orientarea cu care se inseră. Secvența semnal de ancorare în membrană a acestor proteine este localizată aproape de capătul N-terminal.

Proteinele membranare *politopice* străbat membrana cel puțin de două ori, prin secvențe de aminoacizi, în esență hidrofobe. Fiecare dintre segmentele hidrofobe este capabil să orienteze polipeptidul nascent spre membrană și să inițieze inserția prin interacțiunea cu lipidele membranare, după modelul peptidului semnal.

Mecanismul exportului acestor proteine este mai puțin cunoscut decât cel al proteinelor presecretorii, deoarece se sintetizează în cantități mici și nu sunt prelucrate de semnal-peptidaze.

*Proteinele integrate ale membranei externe* ajung în această localizare după ce străbat spațiul periplasmic. Din punct de vedere structural, proteinele membranei externe se aseamănă cu proteinele membranare politopice. Ele au bucle (domenii) expuse la suprafața celulei care pot fi recunoscute specific de fagi sau de bacteriocine, sunt clivate de proteazele exogene sau leagă anticorpi specifici. Analiza proteinelor membranei externe a relevat absența secvențelor cu grad înalt de hidrofobicitate în segmentele care traversează membrana. Explicația constă în faptul că segmentele transmembranare tipic hidrofobe ar acționa ca semnale de stopare a transferului membranar al secvențelor de ancorare și ar împiedica eliberarea polipeptidului din membrana citoplasmatică.

Segmentele transmembranare au secvențe ce pot forma structuri amfipatice cu configurație β-pliată, prin alternarea aminoacizilor hidrofobi și hidrofili. Unele proteine ale membranei externe au configurație β-pliată foarte extinsă. Aminoacizii hidrofobi ai structurii β-pliate sunt orientați spre acizii grași ai membranei externe sau spre aminoacizii hidrofobi ai segmentelor transmembranare adiacente, iar resturile hidrofile interacționează reciproc sau mărginesc pereții unui canal membranar.

Segmentele transmembranare nu sunt perpendiculare pe planul membranei, ci au orientare înclinată.

Proteinele integrate ale membranei externe au o structură adecvată funcției de transport a porinelor: secvențele β-pliate amfipatice legate antiparalel formează un canal hidrofil.

Pentru a explica modul în care proteinele se inseră în membrana externă, s-au propus două ipoteze:

- proteinele se asamblează parțial în membrana citoplasmatică și migrează prin situsurile de contact între cele două membrane, a căror existență este incertă;
- proteinele membranei externe străbat membrana citoplasmatică, trec prin spațiul periplasmic unde se asociază cu chaperoni formând intermediari stabili și se inseră spontan în membrana externă ca rezultat al unor schimbări conformaționale și al interacțiunii cu alte componente ale membranei externe.

Scanned with OKEN Scanner

Proteinele membranei externe au semnal de inserţie în membrana externă. Ultimul aminoacid al ultimului segment transmembranar, virtual la toate proteinele este fenilalanina. Înlocuirea Phe cu aminoacizi neînrudiţi determină o reducere dramatică a inserţiei în membrana externă.

*Spaţiul periplasmic* este compartimentul în care proteinele secretorii adoptă structura terţiară şi quaternară. Multe proteine citoplasmatice au resturi libere de cisteină, dar în mediul reducător al citoplasmei nu formează punţi S-S. Spaţiul periplasmic nu este un mediu reducător, fapt pentru care multe proteine periplasmice sau destinate secreţiei dobândesc legături S-S, sub acţiunea enzimei *protein-disulfid-izomeraza* (PDI), activă şi în lumenul reticulului endoplasmic.

PDI se leagă nespecific de catena polipeptidică, dar afinitatea ei este mai mare în prezenţa resturilor de cisteină. Enzima catalizează izomerizarea legăturilor S-S intramoleculare şi favorizează plierea corectă a unor proteine, funcţie demonstrată prin experienţe realizate *in vitro*.

A doua categorie majoră de molecule, active în spaţiul periplasmic sunt *chaperonii* care inhibă proteoliza, precum şi formarea legăturilor intra- sau intermoleculare incorecte, dar favorizează reacţiile de oligomerizare şi translocaţie. Rolul protector al chaperonilor faţă de proteinele periplasmice aflate în tranzit prin spaţiul periplasmic a fost evidenţiat pentru *pilină*.

### Sinteza exotoxinelor şi endotoxinelor bacteriene

Exotoxinele clasice se sintetizează sub forma unor molecule precursoare, mai lungi decât forma extracelulară a toxinelor de natură proteică. Molecula precursoare are o secvenţă semnal hidrofobă, N-terminală de 15-30 de aminoacizi, cu rol de mediator al transferului membranar al moleculei. Secvenţa semnal este excizată de o peptidază membranară, rezultând proteina hidrofilă, activă funcţional.

După sinteză, molecula de toxină este transferată prin peretele celular, adică prin reţeaua mureinică a bacteriilor Gram pozitive, iar la bacteriile Gram negative şi prin membrana externă. Moleculele de exotoxine sunt mici, au puţine legături disulfidice şi o rigiditate scăzută, ceea ce favorizează transferul lor prin învelişurile celulare.

Eliberarea endotoxinelor, componente ale peretelui celular la bacteriile Gram negative este condiţionată de autoliza sau de distrugerea celulei bacteriene pe cale fizică sau chimică.

S-au identificat câteva mecanisme de transport al toxinelor spre suprafaţa celulei şi în mediul extracelular.

### Mecanismele secreţiei proteinelor bacteriene

La bacterii, după sinteză, proteinele exportate trebuie să traverseze membrana citoplasmatică, ce reprezintă omologul funcţional al reticulului endoplasmic de la

Scanned with OKEN Scanner

celulele eucariote. Spre deosebire de eucariote, la care proteinele destinate transferului în diferite organite se disting pe baza unor *semnale de triere*, recunoscute de unul sau mai mulţi receptori specifici de la nivelul organitului sau pe baza unei proteine pilot, la procariote nu există această diversitate a semnalelor.

Circa 20% dintre polipeptidele sintetizate de bacterii sunt localizate parţial sau complet, la exteriorul citoplasmei. Cele mai multe ajung la destinaţie pe *calea secretorie generală*.

Prima treaptă a transferului este inserţia şi translocaţia în membrana citoplasmatică. La bacteriile Gram pozitive, proteinele translocate prin membrană, ajung în spaţiul extracelular, iar la bacteriile Gram negative, în spaţiul periplasmic, de unde pot fi integrate sau transportate prin membrana externă, pe câteva căi diferite.

*Exportul unei proteine* semnifică transportul ei de la locul sintezei (citoplasma), în altă localizare celulară, care poate fi situată oriunde de-a lungul căii de export: în spaţiul periplasmic, structurile periferice ale celulei (membrana externă), unde poate fi reţinută parţial sau total sau poate fi secretată la exterior.

Termenul de *secreţie* se foloseşte pentru a descrie transportul activ al proteinelor din citoplasmă în mediul extern prin structurile de înveliş ale celulei, iar cel de excreţie se foloseşte pentru transportul moleculelor neproteice: antibiotice, aminoacizi, polizaharide capsulare.

Proteinele exportate se disting de proteinele citoplasmatice prin faptul că se sintetizează ca *preproteine*, cu o *secvenţă semnal* de 10 aminoacizi *hidrofobi* la capătul N-terminal, precedată de câteva resturi *hidrofile*. Toate peptidele semnal au trăsături structurale asemănătoare, deşi la bacteriile Gram pozitive acestea sunt mai lungi şi au mai multe resturi bazice în domeniul N-terminal. Peptidele semnal sunt clivate în timpul translocaţiei proteinei prin membrană.

Secvenţa semnal este necesară orientării proteinelor pe calea de export dar probabil nu mai influenţează transferul ulterior al proteinei pe calea generală de secreţie. Orientarea se face prin legarea semnalului peptidic de membrană, fie direct, fie prin intermediul proteinelor citoplasmatice.

Peptidele semnal purificate interacţionează şi se inseră în monostraturi şi bistraturi fosfolipidice membranare, ceea ce duce la dobândirea unor structuri α-helicale sau β-pliate care orientează contactul între regiunea hidrofobă a acestora şi acizii graşi ai lipidelor. Prin interacţiunea cu lipidele membranare peptidele iniţiază translocaţia. Termenul „translocaţie" semnifică transferul proteinei din citoplasmă *în/prin membrană*.

Interacţiunea eficientă pentru transport, între peptidul semnal şi membrană este mediată de proteine receptoare specifice.

Proteinele destinate exportului nu adoptă conformaţia terţiară în citoplasmă, datorită unor proteine citoplasmatice denumite *chaperoni*, care controlează gradul

Scanned with OKEN Scanner

lor de pliere şi le menţin într-o conformaţie parţial nepliată, compatibilă cu translocaţia. Dacă o proteină dobândeşte conformaţia spaţială definitivă, nu mai poate fi exportată.

Preproteina este orientată spre membrană, prin intermediul peptidului semnal, al chaperonului sau al ambelor.

*Chaperonii* sunt molecule care se asociază cu polipeptidele şi le împiedică să dobândească configuraţia finală atâta timp cât complexul persistă. O altă definiţie accentuează rolul chaperonilor de a preveni proteoliza sau interacţiunile intra- ori intermoleculare, şi de a facilita reacţiile favorabile ca oligomerizarea sau translocaţia.

### *Secreţia proteinelor la bacteriile Gram negative*

Pentru a ajunge din spaţiul periplasmic în mediul extern, proteinele trebuie să depăşească bariera lipidică a membranei externe. Datorită naturii sale lipidice, membrana externă este impermeabilă pentru majoritatea componentelor hidrosolubile. Celula bacteriană comunică cu mediul extern prin intermediul proteinelor inserate în membrană, care au rol de transportori şi captează semnalele din mediu care determină răspunsul adaptativ.

Proteinele destinate periplasmei şi membranei externe sunt sintetizate sub formă de precursori care conţin o extensie N-terminală - *peptidul semnal*. Secvenţa semnal este recunoscută de proteine ale membranei citoplasmatice şi este clivată după ce molecula proteică este translocată de către proteinele *căii generale de export* (*proteinele sec*). Proteina matură este eliberată în *compartimentul periplasmic*, unde mecanismul peptidului semnal şi cel al proteinelor *sec* nu mai sunt funcţionale.

Proteinele care au traversat membrana citoplasmatică şi trebuie să tranziteze spaţiul periplasmic, prezintă *12-14 lanţuri β-pliate antiparalele amfipatice*, esenţiale pentru inserţia în membrana externă.

La bacteriile Gram negative, inserţia regiunii β-pliate în membrana externă nu permite depăşirea acestei bariere, deşi ele sunt capabile să secrete proteine în mediul extracelular, importante pentru numeroase procese fiziologice sau pentru exprimarea potenţialului patogen.

Mecanismele secreţiei proteinelor, la bacteriile Gram negative au fost studiate pe tulpini de *Escherichia coli*, o bacterie care nu secretă proteine, dar care a fost utilizată ca gazdă pentru clonarea genelor unor bacterii care codifică exoproteine. Proteinele se acumulează în spaţiul periplasmic şi astfel a fost posibilă reconstituirea sistemelor de secreţie heterologe.

În anumite cazuri, existenţa peptidului semnal la capătul N-terminal al unei proteine destinată exportului şi localizarea ei periplasmică în celulele de *Escherichia coli* a condus la presupunerea unui mecanism de secreţie în două etape:

Scanned with OKEN Scanner

- în prima etapă, proteina traversează membrana internă prin intermediul căii generale de export;
- în etapa a II-a are loc trecerea prin membrana externă, datorată funcţiilor specifice.

Mecanismele de secreţie a proteinelor au fost studiate la bateriile Gram-negative, care, datorită complexităţii învelişului celular prezintă mecanisme complexe şi variate de secreţie, ce au fost încadrate în 4 tipuri majore notate I–IV, în funcţie de prezenţa secvenţei semnal în molecula de clivare, de proteinele accesorii implicate în secreţie şi de factorii care determină activarea unui anumit mecanism de secreţie.

*Calea generală de export (Calea de tip I)*

Calea de tip I denumită şi calea generală de transport constituie calea cea mai complexă care şi poate realiza secreţia proteinelor dependent sau independent de prezenţa secvenţei semnal în molecula precursoare.

Calea *secretorie generală* este alcătuită din *proteinele Sec* (SecD-SecF, SecY), *Sec A* (ATP-aza) localizată în membrană cu rolul de a furniza energia necesară exportului, *SecB* (chaperon) ce se asociază cu proteinele precursoare şi *semnal peptidaza* periplasmică.

Proteinele necitoplasmatice nascente şi cele nou sintetizate sunt recunoscute de *chaperoni* specifici din citoplasmă care recunosc şi se asociază cu structurile nepliate ale proteinelor (dar nu cu secvenţa semnal). Peptidul semnal pare a avea rol în întârzierea plierii preproteinei.

La *Escherichia coli, Sec A* şi *Sec B* se găsesc în citosol, dar *Sec A* poate fi asociată şi cu membrana citoplasmatică. Legarea lui *SecB* împiedică plierea proteinei într-o conformaţie incompatibilă cu translocaţia şi se leagă cu cele mai multe proteine presecretorii şi cu foarte puţine citosolice. Mutaţiile în gena *secB* reduc eficienţa exportului multor proteine presecretorii, ceea ce a condus la conceptul existenţei a două tipuri de căi de transport: *SecB-dependente* şi *SecB-independente.*

*Calea de tip I Sec-dependentă*

Peptidul semnal interacţionează cu lipidele membranare pentru iniţierea translocaţiei, dar procesul este limitat la un număr mic de situsuri. Eficienţa interacţiunii productive între peptidul semnal şi membrană creşte foarte mult dacă este orientată de proteinele receptoare specifice. Acest rol îl poate avea oricare dintre cele două proteine *Sec* solubile (*SecA* şi *SecB*). Ele pot orienta proteinele presecretoare nascente spre situsul de translocaţie. *SecB* se leagă pe situsuri multiple ale proteinei presecretorii, dar nu peptidele semnal (fig. 2).

Scanned with OKEN Scanner

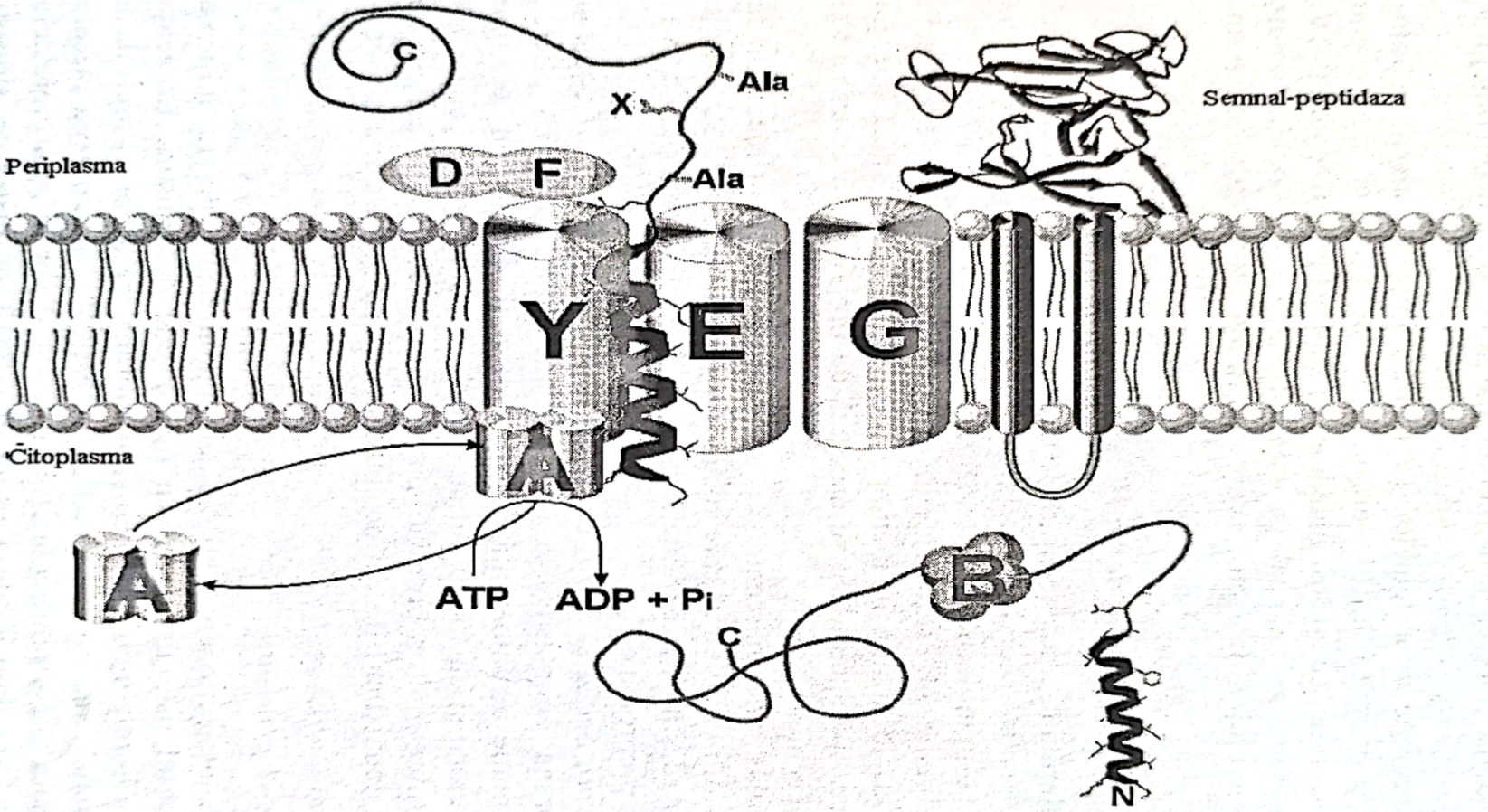



Fig. 2 – Sistemul *sec-dependent* este alcătuit din subunitatea homodimerică de 100 kDa secA şi cea homotetramerică de 17 kD sec B, un canal transmembranar format din sec G (11kD), sec E (9 kD) şi sec Y (47 kD), 2 domenii periplasmice sec D şi sec F care ar avea rol în refacerea plierii proteinelor după ce acestea au fost transportate şi aşa-numita semnal peptidază de tip 1 (32 kD), plasată în spaţiul periplasmic, ancorată pe partea internă a membranei printr-un reziduu N-terminal. Se pare că pre-proteinele nou sintetizate sunt transportate cu sau fără intervenţia sec B pe partea citoplasmatică a membranei, după care are loc translocaţia parţială a pre-proteinei prin membrană sub acţiunea secA, prin canalul secYEG. Pre-proteina rămâne ancorată în membrană până în momentul în care secvenţa semnal este clivată de semnal peptidaza care recunoaşte semnalul specific Ala-X-Ala. Dacă activitatea semnal-peptidazei este alterată, proteina nu se poate desprinde de membrană, antrenând liza şi moartea celulară. Semnal peptidazele au aşadar un rol esenţial în supravieţuirea celulei şi în plus sunt foarte înalt conservate în lumea bacteriană, constituind la ora actuală o nouă ţintă pentru noi clase de antibiotice.

Scanned with OKEN Scanner

Translocaţia proteinei prin membrana citoplasmatică este catalizată de proteina majoră a căii de export, *SecA*, cu localizare membranară. *SecA* (o ATP-ază), probabil un dimer, leagă şi hidrolizează 3 molecule de ATP, iar energia rezultată este utilizată pentru iniţierea translocaţiei. Efectele toxice ale azidei se datorează inhibiţiei activităţii ATP-azice a *SecA*.

În jumătatea N-terminală, *SecA* are o secvenţă identică aceleia care se găseşte în proteinele care leagă nucleotidele (ATP-azele şi kinazele). *SecA* citoplasmatică interacţionează cu proteinele secretorii pe măsură ce emerg din ribosomi. Sinteza ei creşte când exportul este blocat sau saturat.

Celelalte proteine ale căii generale de export au localizare membranară.

Exportul proteinelor necesită atât energia eliberată prin hidroliza ATP, cât şi forţa protonmotrice.

Peptidul semnal are rol important în translocaţie, deoarece induce deschiderea *canalelor* prin care se face translocaţia. Segmentele translocate ale proteinelor presecretoare lipsite total sau parţial de secvenţe hidrofobe, traversează membrana citoplasmatică printr-un canal format din una sau mai multe proteine *Sec* integrate în membrană, fiind astfel complet protejate de contactul cu mediul hidrofob al stratului lipidic (fig. 3). Canalele sunt formate prin modificări conformaţionale ale altor proteine membranare, componente ale căii generale de export.

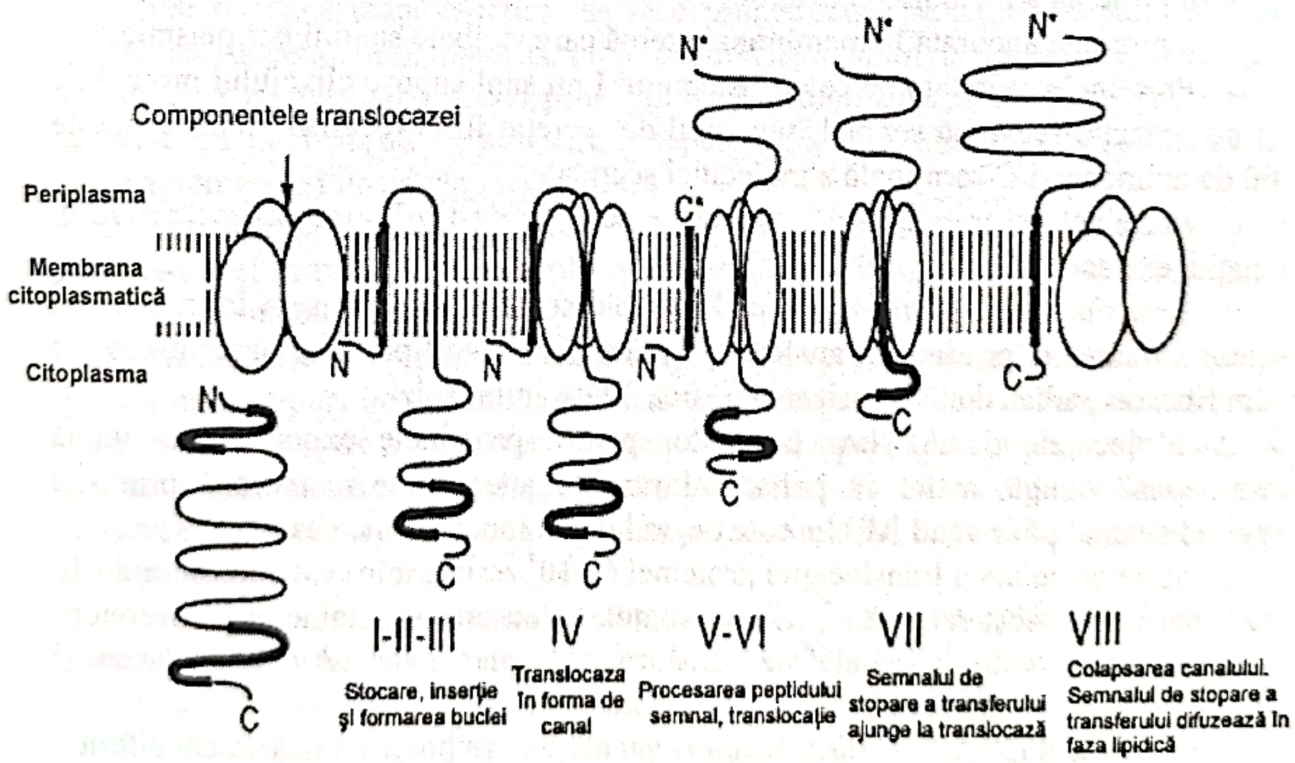



Fig. 3 – Modelul de inserţie a proteinelor de membrană bitopice de tip Ia Sec-dependente, în membrana citoplasmatică. Inserţia iniţială (I–III) este urmată de formarea canalului translocazei, care înglobează domeniul de iniţiere a exportului; translocaţia continuă cu clivarea peptidului semnal (V–VI), până când al doilea segment hidrofob (care conţine semnalul de stopare a transferului) pătrunde în canal, determinând deschiderea sa laterală, ceea ce permite secvenţei de ancorare să difuzeze în stratul lipidic (VIII) (după Pugsley, 1993).

Scanned with OKEN Scanner

Spre deosebire de moleculele mici, care pătrund în permeaze pe o latură (externă sau internă) a membranei şi ies pe cealaltă, proteinele secretorii se ancorează prin peptidul semnal în stratul lipidic şi formează bucle în membrană, înainte de a intra în canalul translocazei. Simon şi Blobel acceptă ideea deschiderii laterale a canalului, prin care este preluat domeniul iniţial al proteinei (fig. 3).

În spaţiul periplasmic, o semnal-peptidază clivează peptidul semnal în timpul sau curând după ce a avut loc translocaţia.

*Calea de tip I Sec-independentă*

Calea Sec-independentă nu implică prelucrarea N-terminală a proteinelor secretate. Secreţia este un proces continuu şi nu necesită prezenţa intermediarilor periplasmici.

Calea de tip I intervine în secreţia α-hemolizinei la *Escherichia coli*, adenilat-ciclazei/hemolizinei la *Bordetella pertussis*, leucotoxinei la *Yersinia haemolytica*, proteazelor la *Pseudomonas aeruginosa* şi la *Erwinia chrysanthemi*.

Sistemul de secreţie de tip I necesită 3 proteine accesorii:

- o ATP-ază din membrana internă, denumită *ABC* (*A*TP *b*inding *c*assette), care furnizează energia de transport;
- o proteină a membranei externe;
- o proteină ancorată în membrana internă care străbate spaţiul periplasmic.

Proteinele secretate pe calea sistemului I nu sunt supuse clivajului proteolitic şi nu prezintă secvenţă semnal, semnalul de secreţie fiind localizat în secvenţa de 60 de aminoacizi C-terminală a moleculei secretate.

Proteinele secretate prin sistemul de secreţie de tip I sunt enzime active în spaţiul extracelular.

*Translocaţia cotranslaţională.* Peptidele semnal se pot insera în membrana citoplasmatică şi pot iniţia transferul pe măsură ce lanţul peptidic nascent emerge din ribosom, adică după polarizarea a circa 70 de aminoacizi.

Moleculele de ARNm codificator pentru proteinele exportate au durată funcţională lungă, astfel că polisomul rămâne ancorat de membrană printr-un peptid semnal până când ARNm este degradat şi traducerea încetează.

Rata calculată a translocaţiei proteinei ($> 10^4$ resturi/min) este de cel puţin 10 ori mai mare decât rata traducerii, secvenţele expuse ale proteinelor presecretorii fiind rapid absorbite în canalul de translocaţie. Cuplarea strânsă între traducere şi translocaţie elimină necesitatea chaperonilor.

În etapa a II-a, *traversarea membranei externe* se poate realiza pe căi diferite:

- unele proteine traversează *membrana externă* prin acelaşi mecanism al *căii generale de export*, datorită secvenţei C-terminale care se inseră în membrană (sistemul de transport de tip IV);
- altele traversează *membrana externă* printr-un *mecanism independent de calea de secreţie* care necesită o *singură proteină auxiliară* sau un aparat de

Scanned with OKEN Scanner

secreţie complex alcătuit din *13-14 proteine*. Cele mai frecvente sunt căile de secreţie complexe (sistemul de transport de tip II).

S-au identificat două căi de secreţie independente de calea generală de export:

- *calea ABC* (*A*TP *B*inding *C*assette), denumită astfel pentru că transportorul conţine o secvenţă membranară la nivelul căreia se leagă molecula de ATP;
- *calea de tip III*, evidenţiată la numeroase bacterii patogene pentru om, animale şi plante.

### *Sisteme de secreţie dependente de calea generală de transport*

#### *Calea de secreţie de tip II*

Este dependentă de prezenţa unei secvenţe semnal scurte, de circa 30 de aminoacizi, predominant hidrofobi, la capătul N-terminal.

Secvenţa semnal este esenţială pentru exportul proteinei şi este clivată de semnal-peptidaza periplasmică.

În *sistemul de secreţie de tip II*, transportul prin membrana externă necesită un set suplimentar de *12-14 proteine auxiliare* ale membranei interne şi externe.

Într-o primă etapă, secreţia se face prin acelaşi mecanism al căii generale (calea sec-dependentă), datorită unui peptid semnal. În etapa a II-a proteinele traversează *membrana externă* prin intermediul unui *aparat complex de secreţie* alcătuit din 12–14 proteine accesorii (chaperoni), a căror sinteză este codificată de gene aglomerate într-un singur operon.

Funcţiile celor 12–14 proteine sunt puţin precizate. Ele sunt localizate în citoplasmă şi în membrana internă, iar funcţia lor se presupune că este aceea de a lega un intermediar periplasmic.

Aceste sisteme reprezintă calea majoră de export la bacteriile Gram negative pentru multe tipuri de molecule diferite, printre care şi câţiva factori de virulenţă. Genele codificatoare ale acestor sisteme formează operoni complecşi, iar mutaţiile produc efecte pleiotrope şi influenţează secreţia mai multor produse. Moleculele au o *secvenţă semnal N-terminală*, a cărei clivare în timpul exportului, este catalizată de o peptidază.

*Klebsiella oxytoca* secretă o singură enzimă extracelulară, *pululanaza* (o lipoproteină). Spre deosebire de alte lipoproteine, acizii graşi ai pululanazei ancorează enzima de suprafaţa celulei, iar lanţul polipeptidic este expus la exterior. Forma ancorată de suprafaţa celulei este eliberată în mediu unde se găseşte sub forma complexelor mari (micelii proteice menţinute în asociaţie de acizii graşi). Eliberarea din membrana externă pare a fi un eveniment spontan.

Secreţia pululanazei necesită 14 factori suplimentari pentru secreţie, codificaţi de un set compact de gene (*cluster*). Cel puţin 7 dintre proteine sunt localizate în membrana citoplasmatică, iar altele sunt proteine ale membranei externe.

Scanned with OKEN Scanner

Pululanaza este singura lipoproteină secretată pe calea generală de export.

Sistemul este funcţional la *Klebsiella pneumoniae,* la Vibrio *cholerae,* la *Pseudomonas aeruginosa* pentru secreţia pilinei N-metil-Phe (de tip 4), pentru înglobarea ADN la *Hemophilus influenzae*, pentru transferul conjugativ al ADN la *Bacillus subtilis*, pentru proteinele stratului S, pentru secreţia factorilor de virulenţă la bacteriile fitopatogene *Erwinia carotovora, Erwinia chrysanthemi, Xanthomonas campestris*. Fiecare dintre aceste bacterii secretă proteine fără omologie din punct de vedere al secvenţei, al structurii sau al funcţiei.

Unul dintre componentele sistemului de transport are un situs de legare a ATP, care furnizează energia de export.

*Calea de secreţie de tip IV*

Calea de secreţie de tip IV este de asemenea dependentă de prezenţa unei secvenţe semnal, înclinarea acesteia, după translocaţia prin membrană, este catalizată prin autoproteoliză. Este funcţională pentru un grup de *proteine autotransportoare*: protează de *Neisseria gonorrhoeae* care clivează IgA, citotoxina vacuolantă de *Helicobacter pylori*, o familie de proteine ale membranei externe la *Bordetella pertussis*, *SepA* de *Shigella flexneri* şi *EspC* de *EPEC*.

Ca şi în sistemul secretor de tip II, aceste proteine sunt exportate din citoplasmă pe *calea sec*, cu clivarea peptidului semnal N-terminal. Proteinele autotransportoare par să formeze un por în *membrana externă*, prin care trec, iar clivajul autoproteolitic eliberează moleculele în supernatant. Sistemul de transport al căii generale de secreţie funcţionează nu numai pentru proteinele proteolitice, ci şi pentru proteine lipsite de această calitate. Clivajul este catalizat de proteine localizate în membrana externă (proteine *Omp- o*uter *m*embrane *p*roteins).

Secreţia de tip IV este calea primară pentru secreţia *enzimelor degradative* extracelulare de către bacteriile Gram negative. Mecanismul secreţiei pe calea generală de transport este funcţional pentru următoarele categorii de molecule:

- proteazele ce clivează regiunea balama a IgA, sintetizate de *Neisseria gonorrhoeae* şi respectiv de *Hemophilus influenzae*;
- o serin-protează, la *Serratia marcescens*;
- o citotoxină vacuolantă (VacA), la *Helicobacter pylori;*
- hemaglutinina Tsh, produsă de *Escherichia coli* patogenă la păsări ;
- Sep A şi Ics A, proteine secretate de *Shigella flexneri*;
- Esp C (*e*xtracellular *s*erine *p*rotease, *c*hromosome encoded), o moleculă secretată de *Escherichia coli* enteropatogenă;
- o familie de proteine ale membranei externe de la *Bordetella pertussis*, care include pertractina şi Brk A (o proteină de rezistenţă la factorii serici).

Cel mai studiat este transportul proteazei ce clivează $IgA_1$, sintetizată de *Neisseria gonorrhoeae*. Molecula se sintetizează sub forma unui precursor (169 kDa), care posedă un peptid semnal N-terminal, un domeniu cu activitate protează şi un domeniu C-terminal. După clivajul peptidului semnal, precursorul

Scanned with OKEN Scanner

este încorporat în membrana externă prin domeniul C-terminal, a cărui structură β-pliată este caracteristică proteinelor membranei externe, iar restul moleculei se localizează la suprafaţa celulei, dobândeşte conformaţia activă şi prin mai multe clivaje autoproteolitice succesive la nivelul unor secvenţe bogate în prolină, se detaşează de membrană. Pentru fiecare moleculă de protează secretată, un domeniu C-terminal este încorporat în membrana externă. În acelaşi mod se secretă IgA-proteaza de *Hemophilus influenzae* şi serin-proteaza de *Serratia marcescens*.

Speciile de *Serratia* secretă numeroase proteine extracelulare prin mecanisme diferite. Hemolizina se sintetizează cu o secvenţă semnal. Secreţia hemolizinei de *Serratia marcescens* (Shl A) prin membrana internă este mediată de peptidul semnal, iar trecerea prin membrana externă necesită *o proteină auxiliară* (Shl B), localizată în membrana externă şi codificată de o genă din acelaşi operon. Proteina membranei externe are şi rolul de a activa hemolizina.

Peptidul semnal este îndepărtat de o protează specifică, *semnal-peptidază*, în timpul translocaţiei. După clivarea secvenţei semnal, proteinele exportate adeseori rămân asociate membranei până când plierea este completă, fiind asistată de chaperoni specifici.

Majoritatea proteinelor presecretorii sunt clivate la 5–7 resturi după domeniul H (hidrofob). La bacterii s-au identificat 3 tipuri de semnal-peptidaze: *LepB*, *LspA* (lipoprotein-signal peptidaza) şi *prepilin IV peptidaza*.

*LepB* este semnal- peptidaza majoră, care nu aparţine nici uneia din cele 4 clase majore de peptidaze (serin-proteaze, aspartat-proteaze, cistein-proteaze sau metaloproteaze), dar are resturi de serină şi aspartat. Situsul de clivaj este pe faţa periplasmică a membranei.

*LspA* – o proteină membranară politopică, neînrudită structural cu LepB, clivează numai proteine presecretorii cu un rest de cisteină imediat după situsul de clivare. Înainte de clivare, restul de cisteină este convertit la gliceril-cisteină şi ulterior modificat prin adăugarea a doi acizi graşi la grupul $NH_2$ rămas liber după clivajul peptidic. Lipoproteinele se identifică uşor prin încorporarea metabolică a palmitatului radioactiv. Peptidele semnal pe care le recunosc diferă de cele recunoscute de LepB: sunt mai scurte şi au o regiune H mai hidrofobă.

*Prepilin IV-peptidaza* este o proteină membranară politopică, care se deosebeşte de *LepB* şi *LspA* deoarece clivează secvenţa semnal pe faţa citoplasmatică a membranei. S-a găsit la bacteriile Gram negative şi Gram pozitive.

Toate cele 3 peptidaze clivează rapid, adeseori în timpul traducerii. Inserţia peptidului semnal şi a domeniului de iniţiere a exportului în membrană, poate fi suficientă pentru producerea clivajului.

În celulele mamaliene, peptidul semnal al proteinelor exportate este recunoscut de un *chaperon* – o structură particulată complexă, alcătuită din 6 polipeptide şi o moleculă de ARN 7 S.

Pentru a ajunge la suprafaţa bacteriei Gram negative, enzimele extracelulare, toxinele şi subunităţile componente ale apendicelor suprafeţei celulare trebuie să traverseze cele două straturi lipidice duble ale membranei interne şi externe.

Scanned with OKEN Scanner

Pilii sunt apendice în general rigide, alungite (2 μm), cu diametrul de 5–10 nm, alcătuiţi din circa 1000 de copii ale pilinei (18 kDa), care se extind la suprafaţă şi permit celulei bacteriene să se fixeze pe receptorii specifici de pe alte suprafeţe celulare.

Pilul P (sau Pap) de la *Escherichia coli* uropatogenă este utilizat ca model pentru a ilustra mecanismul secreţiei şi asamblării pilinei. Proteina piliară majoră este PapA, la care se adaugă câteva piline minore: PapG (adezina) localizată la vârful pilului, care se leagă specific cu receptorul celular (α 1-4- digalactoza); PapE şi PapF, localizate la vârful pilului, împreună cu PapG, iar PapH este localizată la bază.

Toate pilinele se sintetizează ca precursori, cu peptide semnal tipice şi sunt exportate prin membrana citoplasmatică prin sistemul proteinelor *Sec* al căii secretorii generale.

Semnal-peptidaza *LepB* clivează peptidul semnal şi eliberează proteinele piliare în spaţiul periplasmic, unde proteina majoră (pilina PapD) se complexează cu chaperonul specific. Complexul pilină-chaperon persistă până ajunge să interacţioneze cu o proteină a membranei externe, cu rol specific în asamblarea pilului.

### *Sisteme de secreţie independente de calea generală de export*

Sistemele independente de calea generală de export se aseamănă prin absenţa peptidului semnal N-terminal şi a intermediarului periplasmic. Funcţia lor nu necesită în mod direct produsele genelor *sec*. Una dintre proteinele accesorii conţine un domeniu de legare a ATP, care probabil furnizează energie sistemului.

#### *Secreţia prin transportorii ABC (ATP Binding Cassette)*

Se caracterizează prin prezenţa unei ATP-aze membranare, în structura diferiţilor transportori. ATP-azele au un domeniu N-terminal hidrofob cu 6 segmente transmembranare şi un domeniu hidrofil, care poartă o secvenţă de legare a ATP. ATP-azele sunt alcătuite din două jumătăţi asemănătoare în tandem, fiecare având un domeniu hidrofob şi unul hidrofil cu rol de legare a ATP. De aici derivă denumirea lor: domeniul citoplasmatic este considerat ca o casetă proteică constantă, legat cu domeniile hidrofobe variabile.

Proteinele *ABC* au rol în transportul unei mari varietăţi de substraturi. Cele mai cunoscute sunt sistemul MDR (*M*ulti *D*rug *R*esistance) din celulele mamiferelor, care conferă rezistenţă multiplă la medicamente; proteinele $TAP_1$ şi $TAP_2$ ale sistemului CMH I, care realizează translocaţia peptidelor endogene din proteasom în reticulul endoplasmic.

La bacteriile Gram pozitive şi la eucariote, transportorii peptidelor şi proteinelor sunt alcătuiţi dintr-o singură proteină ABC, sub forma unui dimer.

La bacteriile Gram negative sistemele de transport ABC cuprind un grup de proteine care mediază propriul lor transport. Molecula prototip secretată printr-un

Scanned with OKEN Scanner

sistem ABC este *hemolizina* de *Escherichia coli*. Moleculele sunt transportate prin ambele membrane într-o singură treaptă şi necesită 3–4 molecule auxiliare ce formează un *canal transmembranar* prin care se deplasează molecula secretată.

Proteina ABC interacţionează cu cel puţin două proteine auxiliare, una localizată în membrana internă şi alta în membrana externă, pentru a forma transportorul funcţional.

Proteina auxiliară din membrana internă are o secvenţă N-terminală hidrofobă care ancorează proteina în membrana internă, un domeniu mare hidrofil localizat în spaţiul periplasmic şi un domeniu C-terminal care poate dobândi o configuraţie β-pliată, caracteristică proteinelor membranei externe. Topologia membranară a acestor proteine sugerează că ele ar putea fi implicate în formarea zonelor de fuziune locală, între membrana internă şi cea externă. De aceea, se numesc *proteine de fuziune membranară.*

Aceste sisteme de transport sunt specifice, având rol în secreţia unei singure proteine sau a unui grup de proteine omologe. Domeniul specific pentru orientarea extracelulară a exoproteinei este situat în regiunea C-terminală.

Genele codificatoare, plasmidiale sau cromosomale se găsesc la numeroase specii bacteriene, cu secvenţe şi funcţii bine conservate.

Prin acest sistem sunt transportate toxinele omologe, formatoare de pori în membranele diferitelor tipuri celulare de mamifere, secretate de *Proteus mirabilis, Morganella, Yersinia, Actinobacillus* şi *Bordetella pertussis*, *enterotoxina* de *Escherichia coli,* precum şi metaloproteazele de *Serratia marcescens, Erwinia chrysantemi* şi *Pseudomonas aeruginosa*. Transportorii toxinelor sau ai proteazelor enumerate sunt interşanjabili, dar proteaza şi toxina aceleiaşi specii nu sunt secretate pe aceeaşi cale.

Majoritatea exoproteinelor secretate pe calea ABC nu au peptidul semnal N-terminal, dar au o secvenţă C-terminală de circa 50 de aminoacizi care favorizează secreţia.

Genele codificatoare ale moleculelor accesorii se găsesc în acelaşi operon cu gena care codifică sinteza moleculei secretate.

*Sistemul de secreţie de tip III*

Calea de *tip III* este independentă de calea generală de secreţie. Aparatul de secreţie de tip III este alcătuit din circa 20 de proteine, majoritatea fiind localizate în *membrana internă*. Sistemul necesită o ATP-ază citoplasmatică.

Majoritatea proteinelor membranei interne sunt omologe componentelor aparatului de biosinteză a proteinelor flagelare, la bacteriile Gram pozitive şi Gram negative. Genele codificatoare ale proteinelor care formează aparatul de sinteză de tip III sunt grupate şi activate de acelaşi promotor.

Ca şi pentru sistemul de secreţie de tip I, proteinele secretate pe calea sistemului III nu sunt supuse clivajului N-terminal în timpul secreţiei. Semnalul

Scanned with OKEN Scanner

pentru secreţie se găseşte în secvenţa N-terminală de 15–20 de aminoacizi. Proteinele secretate necesită mici proteine citoplasmatice cu funcţii de chaperone pentru protecţia factorilor secretaţi, de interacţia cu alte componente ale sistemului de secreţie.

Sistemele de secreţie de tip III sunt asemănătoare aparatului de biosinteză al proteinelor flagelare. Unele sisteme de secreţie de tip III asamblează structuri macromoleculare la suprafaţa celulei bacteriene, care pot fi implicate în translocaţia în celula eucariotă.

Multe din proteinele secretate prin sistemele de tip III interacţionează direct cu componentele celulare, alterând transducerea semnalelor, sau acţionează în citoplasma celulei eucariote în care sunt translocate.

Sistemele de secreţie de tip III funcţionează la bacteriile Gram negative, sunt inductibile la contactul agentului patogen cu celula gazdă şi în esenţă au rolul de a transloca factorii bacterieni de virulenţă, direct în celula gazdă în timpul infecţiei.

Ele asigură exportul toxinelor secretate de bacterii infecţioase pentru om şi animale ca *Yersinia, Shigella, Salmonella* sau infecţioase pentru plante: *Xanthomonas campestris, Pseudomonas solanacearum, Pseudomonas syringae, Erwinia amylovora.*

Moleculele efectoare secretate prin aceste sisteme sunt numeroase şi au roluri specifice diverse: unele mediază invazia bacteriei, altele paralizează ori omoară celula gazdă.

Proteinele secretate prin sistemul de tip III nu conţin o secvenţă N-terminală. Transferul din spaţiul periplasmic, prin membrana externă, se face cu participarea unui set restrâns de proteine suplimentare sau pe calea secretorie generală alcătuită din cel puţin 12 proteine.

Calea de secreţie de tip III a fost iniţial identificată la *Yersinia*, unde funcţionează pentru secreţia a circa 12 proteine, majoritatea cu rol în virulenţă (proteinele *Yops - Yersinia* outer *p*roteins).

*Shigella flexneri* posedă o plasmidă de virulenţă, din care o regiune de 38 kbp determină capacitatea de invazie a celulelor epiteliale ale mucoasei colonului, cu apariţia simptomelor clinice de dizenterie. Pe această regiune se găsesc circa 15 gene care codifică antigenele *Ipas* (*i*nvasion *p*lasmid *a*ntigen*s*). Antigenele *Ipas* se găsesc pe suprafaţa externă a bacteriei, dar şi în mediul extracelular, fiind necesare pătrunderii în celula gazdă. Aceste molecule nu conţin peptidul clasic cu rol de semnal.

*Salmonella* secretă proteinele *Sip* (*Salmonella* invasion *p*roteins), omologe proteinelor *Ipas*, necesare invaziei celulelor.

Sistemul de secreţie de tip III s-a păstrat la bacteriile Gram negative patogene pentru plante (*Erwinia amylovora, Pseudomonas solanacearum, P. syringae* şi *Xanthomonas campestris*). Pentru studiul determinanţilor de patogenitate s-au folosit mutante care au pierdut atât capacitatea de a produce simptomele la plantele sensibile, cât şi pe aceea de a produce răspunsul *hipersensibil** la plantele rezistente.

Scanned with OKEN Scanner

* Răspunsul hipersensibil al plantelor rezistente nu are nimic comun cu reacţia de hipersensibilitate a mamiferelor şi se caracterizează prin colapsul rapid şi necroza ţesuturilor care au venit în contact cu agentul patogen, urmată de stoparea progresiei procesului infecţios.

Genele care determină procesul infecţios la plantele sensibile şi reacţia hipersensibilă la plantele rezistente s-au denumit *hrp* şi sunt grupate într-o regiune de 20–40 kbp, cu localizare cromosomală sau pe o megaplasmidă (> 1000 kb). Genele codificatoare ale factorilor de patogenitate sunt organizate în mai multe unităţi de transcriere.

Mutantele *hrp* sunt defective atât pentru *p*atogenitatea faţă de plantele sensibile, cât şi pentru capacitatea de a induce *r*eacţia *h*ipersensibilă. Analiza comparativă a tulpinilor mutante *hrp* şi a celor de tip sălbatic a permis evidenţierea câtorva proteine de virulenţă.

Proteina inductoare a reacţiei de hipersensibilitat („*hairpin*") nu are secvenţa clasică N-terminală şi este asociată cu membrana externă, o situaţie omologă cu a proteinelor *Yops* şi *Ipas*, descrise iniţial ca proteine asociate membranei, înainte de a fi secretate în mediul extracelular.

Practic, toate bacteriile Gram negative patogene pentru plante posedă secvenţe omologe genelor *hrp*, cu excepţia bacteriei *Agrobacterium tumefaciens*, care produce procesul patologic printr-un mecanism unic.

Descoperirea genelor de virulenţă la bacteriile patogene pentru mamifere şi la cele patogene pentru plante, a căror secvenţă păstrează un grad semnificativ de omologie a creat o punte de legătură între cele două domenii de cercetare şi ridică probleme de filiaţie între organisme îndepărtate filogenetic (Gijsegem, 1993).

Sistemul de tip III este specializat pentru secreţia factorilor de virulenţă care nu pot difuza şi nu pot pătrunde independent, ci sunt *transferaţi direct în celulă* şi acţionează asupra factorilor intracelulari ai gazdei. În general, expunerea celulelor gazdă la proteine de tip III, în absenţa celulei bacteriene, nu are efect sau efectul este minim.

Activitatea unor sisteme de transport de tip III este dependentă sau este stimulată ca răspuns la contactul bacteriei cu celula gazdă.

Un astfel de mecanism de transport care eliberează factorii de virulenţă direct în celula gazdă, asigură eficienţa interacţiunii şi utilizarea cu randament optim a proteinelor bacteriene.

Sistemul de secreţie de tip III este funcţional pentru biogeneza flagelului la *Pseudomonas aeruginosa*, pentru secreţia proteinei InvA la *Salmonella*, care induce un semnal în celula gazdă, ce determină internalizarea bacteriei. InvA este omologă cu MxiA de *Shigella* şi cu LcrD de *Yersinia*, de asemenea cu rol în secreţia factorilor de invazie.

Există o serie de toxine bacteriene care sunt eliberate din celulă printr-un *mecanism de autotransport* (toxinele-enzime cu activitate *proteazică* specifică care clivează IgA produse de *Neisseria gonorrhoeae, N. meningitidis, Hemophilus influenzae*, *citotoxina vacuolantă* sintetizată de *Helicobacter pylori, serin-proteaza*

Scanned with OKEN Scanner

de *Serratia marcescens, hemaglutinina* de *Escherichia coli*, patogenă pentru păsări, toxinele secretate de *Shigella flexneri* şi de *Escherichia coli* enteropatogenă (EPEC).

### *Exportul proteinelor la bacteriile Gram pozitive*

Pentru bacteriile Gram pozitive, translocaţia precursorului prin membrana citoplasmatică şi clivajul peptidului semnal, pe *calea generală de export*, sunt cel mai adesea suficiente pentru a asigura secreţia proteinelor extracelulare.

Speciile de *Bacillus* sunt utilizate pe scară largă în procesele biotehnologice pentru producerea proteinelor-enzime cu proprietăţi hidrolitice: proteaze, amilaze, RN-aze, levansucraze etc.

La bacteriile Gram pozitive, proteinele sintetizate în citoplasmă, pentru a ajunge în mediul extern, străbat membrana citoplasmatică şi peretele mureinic. Probabil că, asemenea bacteriilor Gram negative, unele proteine sunt integrate spontan în structura membranei, iar cele destinate exportului sunt transportate pe calea generală de secreţie.

Deoarece lipseşte membrana externă, proteinele care traversează membrana sunt eliberate în mediul extracelular sau rămân asociate peretelui. După translocaţie şi clivarea peptidului semnal, unele proteine rămân asociate membranei.

Peretele de *Bacillus subtilis* conţine circa 12 proteine distincte, dar funcţiile se cunosc numai pentru câteva dintre ele. Acestea sunt enzimele *autolitice* (murein-hidrolaze) care hidrolizează componentele parietale şi fac posibilă creşterea celulei şi diviziunea. Genele care codifică unele autolizine au fost clonate şi proteinele secvenţiate. Autolizinele sunt proteine foarte hidrofile şi nu au secvenţa semnal tipică. La capătul N-terminal se găseşte o secvenţă de circa 40 de aminoacizi, asemănătoare peptidului semnal, dar lipsesc resturile aminoacizilor hidrofobi. Nu se cunoaşte cu certitudine localizarea acestor proteine, dar probabil sunt asociate stratului lipidic extern al membranei.

Unele specii de *Bacillus subtilis* au un strat proteic, exterior peretelui peptidoglicanic, alcătuit din 1–2 proteine, ce formează o reţea moleculară organizată. Stratul proteic extern se găseşte nu numai la unele bacterii Gram pozitive, ci şi la multe specii Gram negative. Stratul proteic are pori suficient de mari care-i conferă o bună permeabilitate pentru proteine.

La *Bacillus subtilis*, exoproteinele se sintetizează pe ribosomii asociaţi membranei, ca şi la *Escherichia coli*. Peptidele semnal se aseamănă cu cele de la *Escherichia coli*. Sunt mai lungi (18–35 resturi), cu o regiune N-terminală cu sarcină pozitivă, urmată de o secvenţă hidrofobă şi o secvenţă la nivelul căreia are loc clivarea (Ala-x-Ala) şi au o sarcină netă mai pozitivă decât la bacteriile Gram negative sau la eucariote.

*Peptidele semnal ale lipoproteinelor bacteriene*. Bacteriile exportă proteine care rămân ancorate de lipidele membranei citoplasmatice sau ale membranei

Scanned with OKEN Scanner

externe. Lipidele sunt legate covalent de restul de cisteină de la capătul N al proteinei.

Numeroase lipoproteine se găsesc atât la *Escherichia coli*, cât şi la *Bacillus subtilis*: cele mai cunoscute sunt lipoproteina Braun de *Escherichia coli* şi β-lactamaza de *Baçillus licheniformis*. Unele bacterii Gram pozitive au β-lactamază asociată lamei externe a membranei citoplasmatice.

Peptidele semnal ale lipoproteinelor bacteriene au aceiaşi structură tripartită: capătul N-terminal încărcat pozitiv, o regiune centrală hidrofobă şi o secvenţă de clivare Leu-Ala-Gly---Cys, comună la bacteriile Gram pozitive şi Gram negative.

Lipoproteinele sunt exportate pe aceeaşi cale, la bacteriile Gram pozitive şi Gram negative:

- ca şi alte proteine de export, sunt orientate spre membrana citoplasmatică prin intermediul peptidului semnal. În membrană, restul de Cys este modificat de lipide, prin legarea a *două grupe acil*;
- peptidaza II specifică pentru lipoproteine (substratul său este reprezentat numai preproteinele modificate de lipide) clivează secvenţa semnal;
- după clivare, *un grup acil* suplimentar este ataşat la cisteina N-terminală. Cele *3 grupe acil* hidrofobe ancorează proteina hidrofobă de membrană.

*Propeptidele* sunt secvenţe de aminoacizi localizate între secvenţa semnal şi proteina matură. La *Bacillus subtilis*, secvenţa suplimentară este clivată după translocaţie.

Exoproteinele secretate de *Bacillus subtilis* au secvenţe propeptidice lungi sau scurte.

Proteazele au secvenţe *propeptidice lungi* şi sunt secretate ca *preproenzime*, adică au atât secvenţa semnal, cât şi propeptidul.

Studiile realizate asupra subtilizinei (o serin-protează alcalină) şi unei proteaze neutre (metaloprotează) sintetizate de *Bacillus subtilis* la sfârşitul fazei exponenţiale sugerează că propeptidul are următoarele funcţii:

- previne activarea enzimei în timpul secreţiei. Enzimele proteolitice activate prea timpuriu au efect citolitic. Situaţia este analogă proteazelor celulei eucariote, care sunt secretate ca *zimogen;*
- propeptidele au sarcină electrică mare şi probabil au rol în ancorarea proteazelor de membrană, mediată de interacţiuni ionice;
- au rol în plierea şi activarea proteazelor după translocaţia prin membrană;
- au rol în procesul de export.

Propeptidele lungi au rolul de a plia şi matura preproteazele.

Propeptidele *scurte* ale unor exoproteine de *Bacillus* au un număr mic de resturi de aminoacizi, localizaţi între peptidul semnal şi proteină. Funcţia lor este aceea de a asista plierea proteinelor secretate într-o conformaţie rezistentă la acţiunea proteazelor şi de a le conferi stabilitate. După translocaţie, proteinele sunt eliberate în mediu, cu propeptidele ataşate, dar sunt rapid clivate.

Proteinele secretate de bacterii îndeplinesc funcţii foarte diverse: sunt proteolitice, hemolitice, citotoxice, fosforilante şi defosforilante.

Scanned with OKEN Scanner

### Receptorii celulari pentru toxine

Interacţiunea toxinelor cu celulele sensibile, asemenea altor biomolecule (hormoni, antigene, lectine, factori reglatori etc.) este mediată de molecule specifice denumite *receptori*, situate în stratul extern al membranei citoplasmatice. Celulele sensibile nu au receptori specifici pentru toxine. Toxinele împrumută receptorii, care în mod obişnuit au rolul de a îngloba molecule utile metabolismului celular.

Se cunosc receptorii prin intermediul cărora, câteva toxine interacţionează cu suprafaţa celulei. De exemplu, receptorul celular pentru streptolizina O (SLO), pentru listeriolizină (LLO) şi pentru pneumolizină (PLO) este *colesterolul*. Aceste toxine se fixează pe suprafaţa celulei prin intermediul colesterolului membranar şi nu depind de alţi receptori de suprafaţă. De aceea, teoretic, ele pot să lizeze membranele oricărei celule animale.

Toate toxinele acestui grup sunt alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică, a cărei lungime variază de la 471 aminoacizi (pentru pneumolizină) până la 571 pentru streptolizina O. Variaţia lungimii se datorează în întregime secvenţelor localizate la capătul N-terminal, a căror funcţie rămâne necunoscută. Cea mai lungă secvenţă, cu omologie aproape perfectă la toxinele grupului este de 11 aminoacizi şi este bogată în triptofan.

Secvenţa comună pentru toate aceste molecule şi esenţială pentru activitatea citolitică corespunde celei mai mici secvenţe - a *pneumolizinei*. Pneumolizina se deosebeşte de celelalte toxine ale grupului, prin absenţa peptidului semnal secretor şi din această cauză este eliberată numai prin liza celulelor de *Streptococcus pneumoniae*.

Aceste toxine nu se leagă de membranele care nu conţin colesterol sau un compus înrudit cu colesterolul. Interacţiunea cu colesterolul se produce în absenţa altor lipide. Toxinele interacţionează chiar cu sterolul pur în soluţie sau în suspensie şi rezultatul este inhibiţia activităţii litice.

Alte câteva toxine au ca receptori moleculele de *gangliozide*. Acestea sunt *glicolipide*, mai abundente în neuroni, alcătuite dintr-o componentă oligozaharidică legată de un ceramid (acid stearic şi sfingozină). Gangliozidele diferă între ele, prin numărul şi secvenţa resturilor glucidice componente, în special a acidului N-acetil neuraminic (NANA) sau de acid sialic.

Toxina *tetanică* se leagă de gangliozide, în special de di- şi trisialogangliozide, care conţin două şi respectiv trei resturi de acid sialic, ataşate de galactoză. Între toxina tetanică şi hormonul tirostimulator (TSH) există o competiţie de legare strict reciprocă, pe membrana celulelor tiroidiene. Astfel, s-a dedus că receptorul neuronal pentru toxina tetanică este asemănător cu receptorul celulei tiroidiene pentru TSH.

Scanned with OKEN Scanner

Receptorul celular pentru toxina *holerică*, ca şi pentru toxina termolabilă de *Escherichia coli*, foarte asemănătoare toxinei holerice este gangliozidul $GM_1$. S-a evidenţiat o corelaţie directă între conţinutul membranar în $GM_1$ şi sensibilitatea tisulară la toxină.

Receptorul celular al toxinei de *Bordetella pertussis* pare a fi tot o gangliozidă care conţine acid sialic, iar receptorul toxinei difterice ar fi o glicoproteină.

În raport cu localizarea ţintei lor moleculare se disting doua categorii de toxine:

- cele care au ţinta finală la nivelul *membranei*;
- toxine a căror ţintă finală este *citoplasmatică*.

Ţinta finală este structura a cărei interacţiune cu toxina produce efectul toxic, în timp ce receptorul are uneori rolul de ţintă intermediară, deşi alteori este chiar ţinta finală.

Toxinele care acţionează la nivelul *membranei* sunt active prin modificări structurale pe care le induc în membrana citoplasmatică, urmate de ruperea acesteia. Consecinţa este *citoliza* ori moartea celulei. Toxinele care consecutiv acţiunii lor produc dezorganizarea membranei se numesc *citolizine* (respectiv *hemolizine*, dacă celula ţinta este eritrocitul).

Toxinele a căror ţintă finală este intracelulară, mai întâi traversează membrana şi ajung în citoplasmă.

Moleculele suprafeţei *eritrocitului*, cu rol de receptor pentru toxinele bacteriene, sunt *glicolipidele*. Legarea toxinelor de glicolipide pare a fi mai avantajoasă decât legarea de glicoproteine, pentru interacţia cu membrana, care este esenţială pentru acţiunea toxică.

**Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă**

Toxinele bacteriene a căror ţintă este intracelulară sunt molecule bifuncţionale, ca şi toxinele vegetale (ricina, abrina), bacteriocinele sau hormonii glicoproteici. Toate aceste categorii de molecule sunt alcătuite după acelaşi model funcţional, fiind monomere (de exemplu, toxina diftерică, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*) sau dimere (de exemplu, enterotoxina holerică şi cea termostabilă de *Escherichia coli*). Cele monocatenare au o secvenţă COOH-terminală, prin care se leagă la nivelul receptorului şi o secvenţă $NH_2$-terminală, care pătrunde în citoplasmă şi interacţionează cu ţinta intracelulară (fig. 4). Pentru toxinele dublu catenare, funcţiile de legare *B* (*B*inding) şi de activitate propriu-zisă *A* (*A*ctivity) sunt realizate separat de fiecare catenă.

Scanned with OKEN Scanner

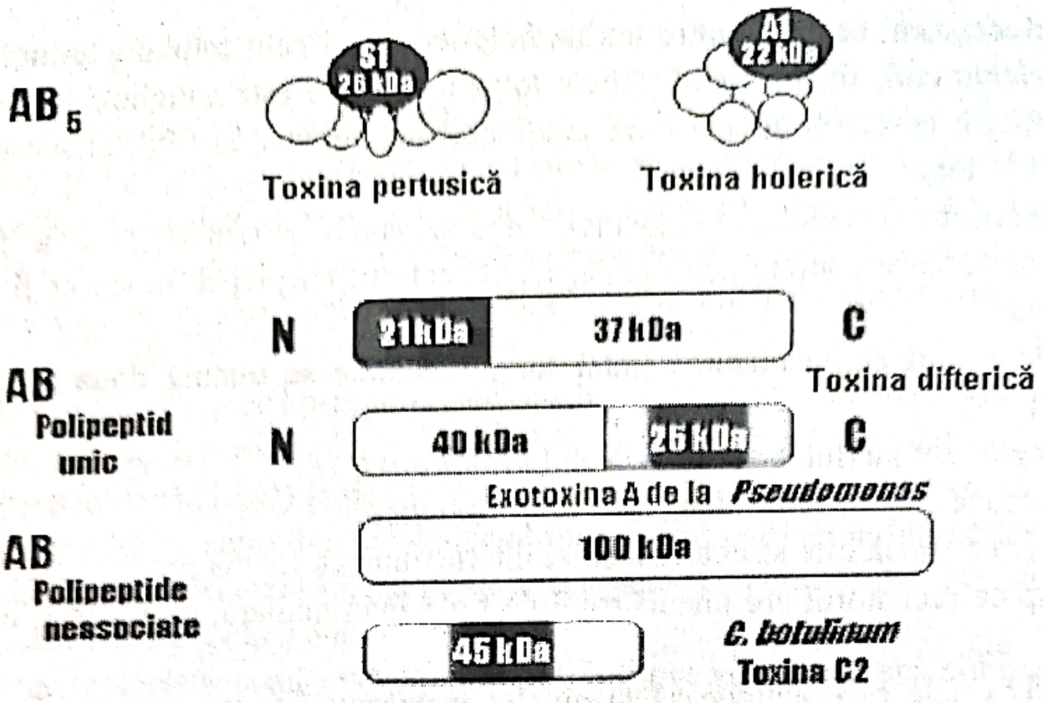



Fig. 4 – Reprezentarea schematică a modelelor structurale ale exotoxinelor de tip AB (după Faruque şi colab., 2001).

Pătrunderea moleculei de toxină în celulă este un proces complex pentru majoritatea toxinelor cu acţiune intracelulară şi se face prin unul din următoarele mecanisme (fig. 5):

- endocitoza mediată de receptori;
- pinocitoza nespecifică în faza lichidă;
- transferul direct al moleculei prin membrana citoplasmatică.

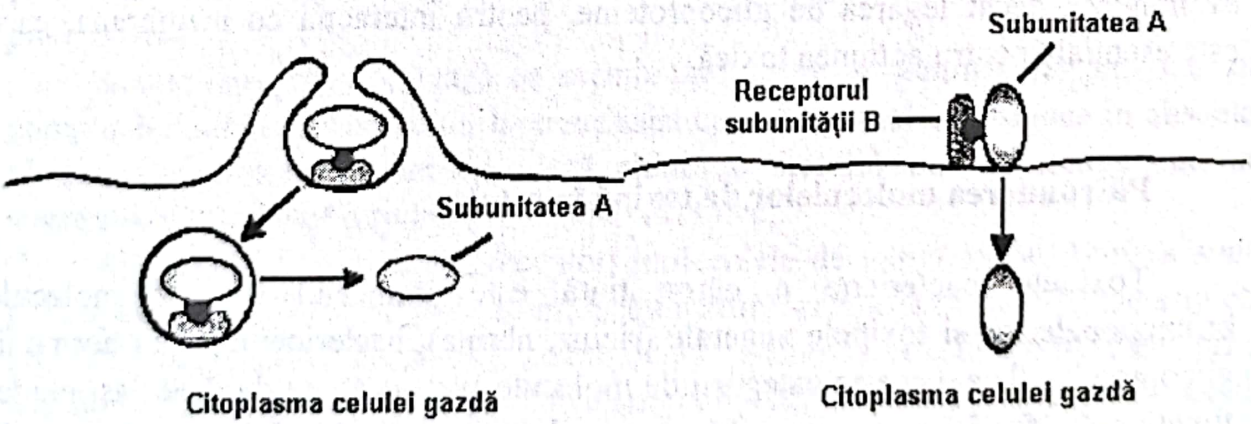



Fig. 5 – Mecanisme de pătrundere a toxinelor de tip AB în celula gazdă, prin endocitarea complexului toxină-receptor (stânga) şi penetrarea membranei de către subunitatea A şi accesul direct în citoplasmă (după Kaiser, 2001).

Înglobarea prin mecanismul endocitozei mediate de receptori conferă specificitate şi eficienţă acţiunii moleculelor mari. Receptorii celulari glicoproteici, după interacţiunea cu moleculele de toxină, suferă o dinamică accentuată. În mod normal, moleculele cu rol de receptor sunt uniform distribuite în planul membranei

Scanned with OKEN Scanner

sau sunt concentrate în teritorii specializate denumite zone *tapetate cu clatrină** (*coated pits*), un înveliş de natură proteică pe faţa citoplasmatică a membranei. După legarea moleculei de toxina, complexele receptor-toxină se aglomerează în zonele tapetate cu clatrină, situate la baza microvilozităţilor. Zonele respective se intruzează şi formează *vezicule acoperite cu clatrină*, cu rol de transport. În citoplasmă, învelişul de clatrină se dezorganizează şi receptorii celulari deveniţi disponibili sunt reciclaţi spre suprafaţa celulei, iar molecula de toxină este eliberată spre un situs intracelular specific.

*Clatrina este o proteină mare, oligomerică, ce formează o reţea pe suprafaţa internă a membranei plasmatice, favorizând intruzia membranei şi formarea unei vezicule tapetată cu reţeaua moleculară, care ulterior poate fuziona cu alte organite celulare.

## Mecanisme generale ale acţiunii toxinelor bacteriene

Efectul biologic al exotoxinelor este specific şi este datorat afinităţii lor caracteristice pentru anumite celule-ţintă ale organismului.

Unele toxine (tetanică, difterică, botulinică, holerică, eritrogenă) au un rol determinant in patogenitatea bacteriană. Primele patru enumerate mai sus, sunt factori unici ai patogenităţii pentru bacteriile producătoare. În cazul holerei, gravitatea infecţiei este consecinţa efectelor fiziopatologice nespecifice ale toxinei asupra mucoasei intestinale ce constau în pierderea apei şi sărurilor minerale la acest nivel.

Eritemul specific scarlatinos, produs de *Streptococcus pyogenes* se datorează efectului primar al toxinei eritrogene streptococice.

Enterotoxinele stafilococice şi enterotoxina de *Clostridium perfringens* produc efecte la nivelul mucoasei intestinale, ca rezultat al intoxicaţiei alimentare.

Toxina produsă de *Shigella dysenteriae* este cauza dizenteriei, deoarece enterocitele şi celulele endoteliale ale vaselor mici se lizează sub acţiunea toxinei, rezultatul fiind ulcerarea mucoasei intestinale.

Exotoxina de *Bacillus anthracis* produce un edem local şi hemoragie, iar în cazul septicemiei, efectul letal pare a fi datorat neurotropismului său, cu acţiune în special asupra centrului bulbar al respiraţiei.

Uneori, toxine foarte asemănătoare cauzează boli foarte diferite. De exemplu, toxina *botulinică* este ingerată oral şi produce paralizia flască a muşchilor striaţi, prin blocarea transmiterii potenţialului la nivelul plăcii motorii. Toxina tetanică, produsă în rănile profunde infectate cu *Clostridium tetani*, produce paralizia spastică, prin SNC.

Efectele biologice ale toxinelor se produc la nivelul diferitelor structuri celulare. De exemplu, hemolizinele şi leucocidinele acţionează la nivelul membranei citoplasmatice, iar alte toxine sunt active asupra organitelor, asupra catenei transportoare de electroni s.a.m.d.

Scanned with OKEN Scanner

Toxinele perturbă funcţiile celulei gazdă: influenţează căile de transducere a semnalelor, rearanjează citoscheletul şi traficul vacuolar.

Toxinele bacteriilor Gram pozitive, în general, nu necesită activare. Multe toxine ale bacteriilor Gram negative sunt sintetizate însă în formă inactivă şi necesită o etapă de prelucrare, care constă în clivajul proteolitic, pentru a genera forma activă.

Toxinele cu acţiune enzimatică (toxina Shiga, toxina holerică, toxina pertusică, toxina difterică şi exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*) sunt clivate proteolitic pentru a produce fragmentul A catalitic activ.

Multe toxine neenzimatice care se inseră în membrana celulei eucariote, necesită clivajul proteolitic pentru a permite oligomerizarea şi formarea porilor: hemolizina de *Vibrio cholerae* El Tor este clivată N-terminal, iar aerolizina, toxina α de *Clostridium septicum* şi citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* sunt clivate C-terminal. Hemolizina de *Escherichia coli*, formatoare de pori, reprezintă o clasă unică de toxine ce necesită prelucrarea posttraducere pentru activare.

Unele toxine au un plan structural şi mecanisme de acţiune comune, ceea ce permite gruparea lor în câteva familii.

### *Toxine cu activitate ADP-ribozilantă*

Multe exotoxine au o *structură de tip A-B*, adică sunt formate din două componente: subunitatea B (*B*inding), care mediază legarea moleculei şi pătrunderea ei în celula sensibilă; subunitatea A (*A*ctivity), care determină efectul enzimatic (toxic) specific (fig. 6). Domeniul B are cea mai largă variaţie, probabil pentru a conferi specificitate de legare de substratul celular sensibil.

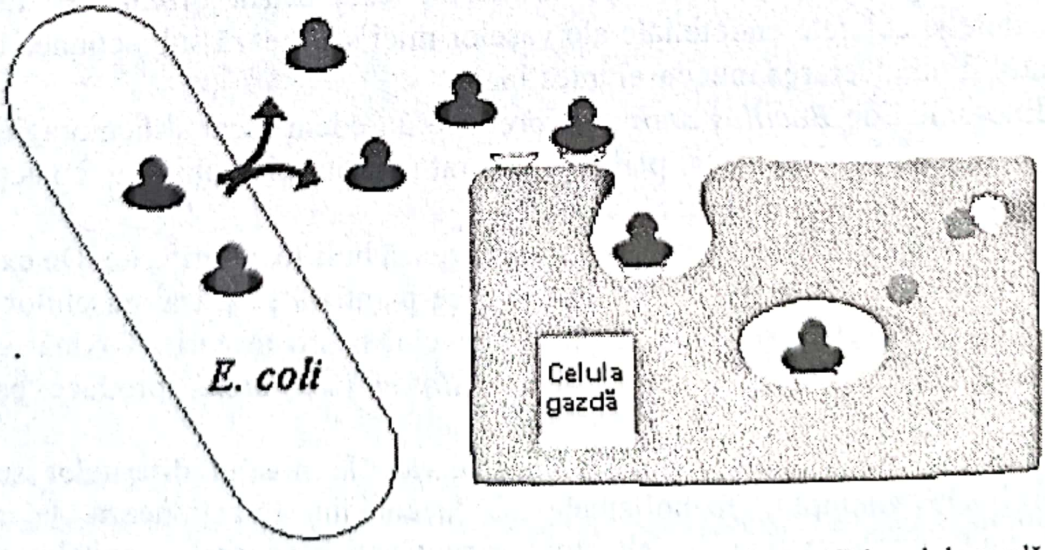



Fig. 6 – Ilustrarea mecanismului de pătrundere al toxinelor de tip AB în celula gazdă prin endocitoză mediată de receptori.

Scanned with OKEN Scanner

Activitatea enzimatică a subunității A produce efecte foarte variabile, de la cea ADP-ribozilantă (toxinele holerică, pertusică, difterică, toxina termolabilă de *Escherichia coli*, exotoxina A de *Pseudomonas*, ADP-ribozil-transferazele – $C_2$ și $C_3$ produse de *Clostridium botulinum*), până la acțiune *proteolitică* (toxinele tetanică și botulinică). Toxinele ADP-ribozilante au ca situs comun de legare NAD-ul și *transferă ADP-riboza* de la NAD și o leagă covalent la proteine ale celulei eucariote, după reacția globală:

$NAD^+$ + Proteina țintă ⟶ ADP-riboza- Proteină + Nicotinamida + $H^+$ (fig. 7).

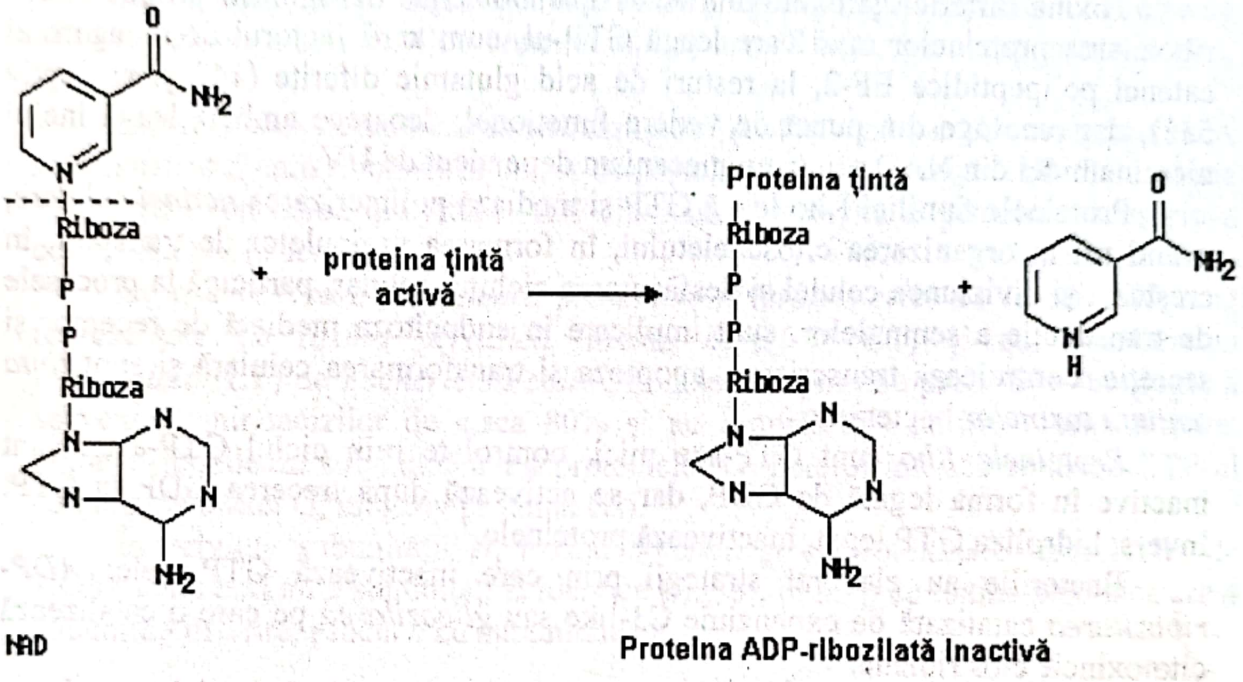



Fig. 7 – Reprezentarea reacției de ADP-ribozilare.

Unele dintre aceste exotoxine se asociază cu proteine cu rol important în fiziologia celulară, care au capacitatea de a lega nucleotidele și produc ADP-ribozilarea:

- unor proteine heterotrimerice care leagă GTP;
- unor proteine mici care leagă GTP;
- actinei;
- altor proteine ale celulei eucariote, care nu au fost încă identificate.

Exotoxinele ADP-ribozilante au trei tipuri de organizare A-B:

- proteine polipeptidice unice, cu componentele A-B legate covalent;
- complexe cu componente A-B localizate pe proteine separate, legate prin interacțiuni necovalente;
- complexe multiproteice cu componente A-B localizate pe două proteine separate.

Pentru unele exotoxine ADP-ribozilante, nu s-a evidențiat organizarea structurală de tip A-B.

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismele activării *in vitro* a exotoxinelor ADP-ribozilante cu organizare de tip A-B sunt:

– proteoliza parţială şi generarea peptidului A activ cu activitate catalitică;
– reducerea legăturilor S-S;
– activarea alosterică de către nucleotide sau de către proteinele accesorii ale celulei eucariote.

Modelul de acţiune ADP-ribozilant s-a elaborat pe baza proprietăţilor moleculare ale *toxinei difterice*, *exotoxinei A* de *Pseudomonas aeruginosa* şi *enterotoxinei* termolabile de *Escherichia coli*.

Toxina difterică şi exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* produc ADP-ribozilarea proteinelor mari care leagă GTP-ul, cum ar fi factorul de elongare al catenei polipeptidice EF-2, la resturi de acid glutamic diferite (148 şi respectiv 553), dar omologe din punct de vedere funcţional, deoarece ambele leagă inelul nicotinamidei din NAD printr-un mecanism dependent de UV.

Proteinele familiei Rho leagă GTP şi mediază polimerizarea *actinei* celulare, având rol în organizarea citoscheletului, în formarea veziculelor de transport, în creşterea şi diviziunea celulei şi desfăşurarea ciclului celular, participă la procesele de transducţie a semnalelor, sunt implicate în endocitoza mediată de receptor şi secreţie, controlează transcrierea, apoptoza şi transformarea celulară şi sunt *ţinta acţiunii toxinelor* bacteriene.

*Proteinele Rho* sunt GTP-aze mici, controlate prin ciclul GTP-azei: sunt inactive în forma legată de GDP, dar se activează după trecerea GDP în GTP. Invers, hidroliza GTP legat, inactivează proteinele.

Bacteriile au elaborat strategii prin care inactivează GTP-azele: *ADP-ribozilarea* catalizată de exoenzime C3-like sau *glicozilarea* pe care o catalizează citotoxinele clostridiene.

Exotoxinele care catalizează ADP-ribozilarea proteinelor mici care leagă GTP sunt: exoenzima $C_3$ de *Clostridium botulinum*; exoenzima de *Clostridium limosum*; exoenzima de *Bacillus cereus*; exoenzima S de *Pseudomonas aeruginosa*.

Exoenzima $C_3$ de *Clostridium botulinum* şi cea de *Clostridium limosum* sunt proteine de 24 kDa, neînrudite cu neurotoxina botulinică. Au omologie de 70% şi dau reacţii imunologice încrucişate.

Aceste exoenzime se leagă de proteine Rho şi Rac din diferite ţesuturi, cu GM 21 şi respectiv 24 kDa, pe care le modifică prin ADP-ribozilare. Pentru exotoxina $C_3$ situsul reacţiei este Asn-41. Toate transferazele asemănătoare lui C3 sunt proteine bazice (punctul izoelectric > 9). După injectare, aceste exoenzime produc efecte citotoxice.

În supernatantul de *Bacillus cereus* s-a evidenţiat o activitate ADP-ribozil-transferazică, asemănătoare cu aceea a exoenzimei $C_3$ de *Clostridium botulinum*. Ambele par să acţioneze asupra aceluiaşi substrat.

Modularea reorganizării filamentelor de actină se poate realiza şi prin ADP-ribozilarea directă a filamentelor de actină. Familia exotoxinelor cu acţiune ADP-ribozilantă asupra actinei include: ADP-ribozil-transferaza $C_2$ de *Clostridium*

Scanned with OKEN Scanner

*botulinum*; ADP-ribozil-transferaza de *Clostridium difficile*; toxina iota de *Clostridium perfringens*; toxina de *Clostridium spiroforme*.

Sunt toxine binare, la care cele două fragmente (A şi B) se găsesc ca proteine separate, neasociate.

ADP-ribozil-transferaza $C_2$ de *Clostridium botulinum* (denumită $C_2$) este alcătuită din subunitatea $C_2I$ (50 kDa) şi corespunde subunităţii A. Efectul toxic constă în catalizarea reacţiei de ADP-ribozilare a actinei monomerice purificate şi a actinei în lizatele celulare, la restul de Arg-177. Actina ADP-ribozilată nu mai polimerizează. $C_2II$ este componenta B a toxinei.

*Toxina iota* este produsă de *Clostridium perfringens* tip E şi efectul ei este de ADP-ribozilare a actinei. Componenta A (Ia) are 48 kDa, iar componenta B (Ib), 72 kDa.

*Pseudomonas aeruginosa* sintetizează două ADP-ribozil-transferaze: exotoxina A şi *exoenzima S* care ribozilează un set de proteine mici care leagă GTP. Exoenzima S, pentru exprimarea activităţii ADP-ribozilante necesită o proteină accesorie a celulei eucariote sensibile.

*Exotoxinele care ribozilează proteinele heterotrimerice ce leagă* GTP sunt reprezentate de *toxina pertusică*, *toxina holerică* (CT) şi de *enterotoxina termolabilă* (LT) de *Escherichia coli*. Ultimele două toxine prezintă o omologie a secvenţei aminoacizilor de circa 80% şi au proprietăţi catalitice asemănătoare: ambele ribozilează subunitatea α a proteinelor $G^*$ heterotrimerice ce leagă GTP-ul (proteinele clasei G, inclusiv proteina Gs).

În privinţa subunităţii B, toxina holerică şi enterotoxinele termolabile de *Escherichia coli* au 5 subunităţi B identice (fig. 8), în timp ce toxina pertusică are 4 subunităţi diferite, asociate cu subunitatea A.

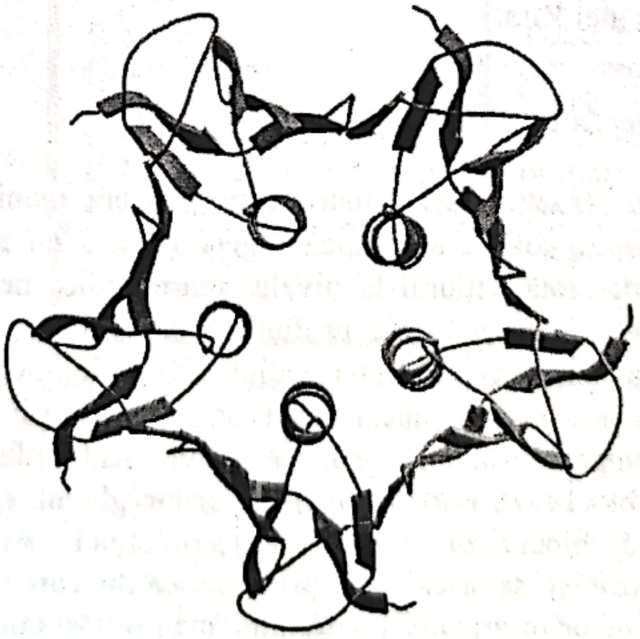


Fig. 8 – Structura pentamerului de toxina termostabilă de *Escherichia coli*.

Scanned with OKEN Scanner

### *Toxine care inactivează proteinele Rho prin alte mecanisme decât ADP-ribozilarea*

Diferite toxine (factorul necrozant de tip 1 produs de *Escherichia coli* citotoxică, toxinele A şi B de *Clostridium difficile*) interacţionează cu proteinele *Rho*, pe care le modifică prin *glicozilare* şi le *inactivează*. Astfel determină dezagregarea filamentelor de actină. Toxinele A şi B de *Clostridium difficile* au ca ţintă celulară proteinele Rho pe care le inactivează prin glicozilare. Cele două toxine sunt citopatice pentru diferite tipuri celulare *in vitro*. După tratament, celulele îşi retractă prelungirile şi se rotunjesc. Aceste modificări sunt consecinţa dezasamblării actinei *f*ilamentoase (F), evidenţiată prin pierderea actinei F şi creşterea actinei globulare (G), înainte de rotunjire.

Citotoxina hemoragică şi letală de *Clostridium sordelii* şi α-toxina de *Clostridium novyi*, ambele implicate în gangrena gazoasă, sunt de asemenea glicozil-transferaze asemănătoare cu toxinele de *Clostridium difficile*.

Rotunjirea celulei este produsă de un număr foarte mic de molecule de toxină A şi B, ceea ce a condus la presupunerea unui mecanism de acţiune enzimatică asupra proteinelor care reglează polimerizarea şi asamblarea fibrelor.

Toxinele dermonecrotice (DNT) sunt produse de toate speciile de *Bordetella*. Genele pentru DNT la *Bordetella pertussis* şi *Bordetella bronchiseptica* sunt identice în proporţie de 99% şi se aseamănă cu factorii citotoxici necrozanţi 1 şi 2 (CNF) de *Escherichia coli*.

DNT stimulează sinteza ADN dar în acelaşi timp, inhibă diviziunea celulară, având drept consecinţă apariţia celulelor multinucleate. CNF 1 şi 2 induc formarea celulelor multinucleate şi dezorganizarea locală a membranei. CNFs produc dezaminarea proteinei Rho.

### *Toxine proteolitice*

Toxinele cu structură asemănătoare pot genera manifestări clinice foarte diferite. De exemplu, toxina botulinică ingerată odată cu alimentele, produce o paralizie flască, datorată acţiunii la nivelul terminaţiilor nervoase periferice, iar toxina tetanică, eliberată în rănile profunde contaminate cu *Clostridium tetani* produce paralizia spastică prin intermediul sistemului nervos central. Ambele toxine acţionează prin acelaşi mecanism: blocarea eliberării mediatorilor sinaptici prin clivarea *sinaptobrevinelor*, proteine componente ale veziculei sinaptice. Toxina tetanică blochează eliberarea mediatorilor glicină şi GABA, în timp ce toxina botulinică blochează eliberarea acetilcolinei. Ambele proteine sunt *metaloendoproteaze* şi se aseamănă prin domeniile care leagă Zn. Modul de pătrundere a toxinelor în organism determină manifestări clinice distincte, deşi ele sunt foarte asemănătoare.

Scanned with OKEN Scanner

### *Toxine formatoare de pori*

Numeroase microorganisme patogene, cu localizare intracelulară produc proteine care pot să lizeze membrana celulei eucariote. Câteva dintre aceste toxine sunt esenţiale pentru patogenitate. Rolul lor este diferit, de la blocarea funcţiei celulelor imunitare, până la medierea ieşirii din vacuola de fagocitoză în citosol.

Toxinele SLO, LLO, PLO aparţin familiei toxinelor activate de gruparea *thiol* (tabelul 1). Capacitatea lor de a *forma pori* depinde de o secvenţă conservată de aminoacizi la capătul C terminal, care conţine resturi de Trp, esenţiale pentru formarea porilor şi un rest de Cys, care le face intolerante la condiţiile oxidante.

*Tabelul 1*

Familia toxinelor tiol-activate care leagă colesterolul

| Genul | Specia | Toxina |
|---|---|---|
| *Streptococcus* | *S. pyogenes* | SLO |
| | *S. equisimilis* | SLO |
| | *S. canis* | SLO |
| | *S. pneumoniae* | Pneumolizina |
| | *S. suis* | Suilizina |
| | *S. intermedius* | Intermedilizina |
| *Bacillus* | *B. cereus* | Cereolizina O |
| | *B. alvei* | Alveolizina |
| | *B. thuringiensis* | Turingiolizina O |
| | *B. laterosporus* | Laterosporolizina |
| *Clostridium* | *C. tetani* | Tetanolizina |
| | *C. botulinum* | Botulinolizina |
| | *C. perfringens* | Perfringolizina O |
| | *C. septicum* | Septicolizina O |
| | *C. histolyticum* | Histoliticolizina O |
| | *C. novyi* | Novilizina |
| | *C. chauvoei* | Chauveolizina |
| | *C. bifermentans* | Bifermentolizina |
| | *C. sordelli* | Sordelilizina |
| *Listeria* | *L. monocytogenes* | Listeriolizina O |
| | *L. ivanovii* | Ivanolizina |
| | *L. seeligeri* | Seligerolizina |
| *Arcanobacterium* | *A. pyogenes* | Piolizina |

Toxinele *thiol*-activate recunosc colesterolul din membrana celulelor eucariote şi induc formarea unor pori de dimensiuni foarte mari (până la 30 nm), inelari sau în formă de arc (aceşti pori sunt de dimensiuni mai mici), alcătuiţi din circa 50 de monomeri de toxină (fig. 9). Cantitatea de colesterol membranar trebuie să depăşească cu câteva ordine de mărime cantitatea de toxină, pentru a avea loc o interacţie stabilă, probabil din cauza unor restricţii sterice sau termodinamice.

Scanned with OKEN Scanner

Colesterolul nu are doar rol de receptor pentru moleculele de toxină, ci mediază şi oligomerizarea monomerilor de toxină, acţionând probabil ca un efector alosteric.

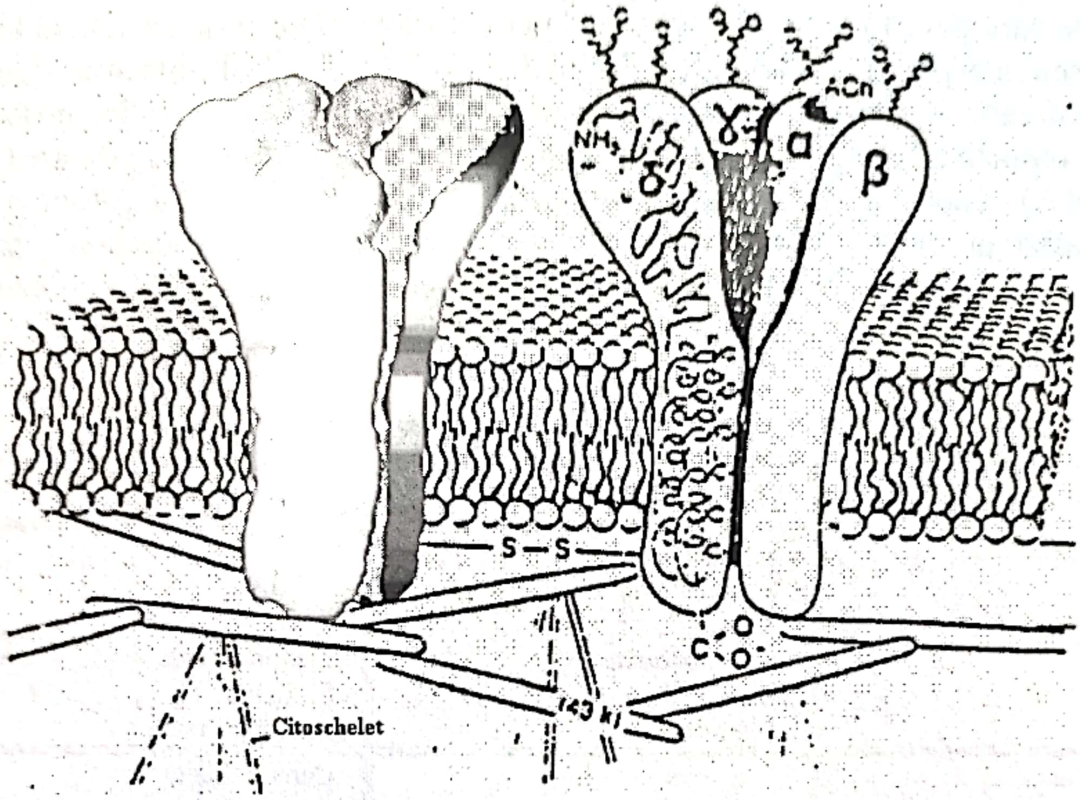



Fig. 9 – Reprezentarea schematică a mecanismului de acţiune al toxinelor formatoare de pori.

Toxinele thiol-activate sunt alcătuite din 4 domenii, dintre care domeniul 4 este implicat în legarea de receptor (colesterol). Legarea iniţială de colesterol este total reversibilă, se realizează foarte rapid şi independent de temperatură. După legarea iniţială, domeniile 1 şi 3 implicate în oligomerizare suferă modificări alosterice care conduc iniţial la apariţia unui pre-por metastabil, care ulterior este stabilizat prin forţe de tensiune superficială cu apariţia porului stabil, în formă de inel. Porii incompleţi, în formă de arc, permit de asemenea inserţia moleculelor de toxină în membrană. Rolul biologic major al acestor toxine este de a permite pătrunderea în interiorul celulei eucariote a altor toxine sau enzime bacteriene, prin porii de dimensiuni mari. În cazul bacteriilor intracelulare, aceste toxine (ex. listeriolizina) permit propagarea infecţiei de la o celulă la alta.

Toxinele thiol-activate se găsesc la bacterii care au un mod de viaţă asemănător. *Listeria* şi *Streptococcus* produc infecţii invazive, iar toxinele lor sunt determinanţi de patogenitate. Aceste bacterii produc enzime depolimerizante (proteaze, nucleaze) şi sunt secretate concomitent cu toxinele. Deoarece porii formaţi de toxinele activate de thiol sunt mari, ei constituie calea de acces a acestor enzime în interiorul celulei. Toxina şi enzimele cooperează pentru degradarea celulelor animale, în beneficiul agentului patogen.

În cazul infecţiilor clostridiene – gangrena gazoasă sau tetanosul, cele două moduri de viaţă prezintă convergenţe evidente: toxinele pot fi implicate atât în

Scanned with OKEN Scanner

stadiul inițial al lezării țesutului, necesar pentru realizarea unui mediu anaerob, cât și în stadiul tardiv (postmortem), caracterizat prin distrugere tisulară rapidă și masivă.

Listeriolizina este produsă intracelular și se abate de la condițiile de acțiune ale altor lizine, prin necesarul unui pH acid optim pentru acțiunea ei. Mediul acid este creat în fagosom, din care *Listeria* se eliberează singură prin secreția toxinei.

Unele toxine funcționează prin *inserția în membrana* celulei sensibile. Rezultatul este formarea unui por sau canal, care duce la liza celulei prin mecanisme osmotice. O astfel de familie este formată de *toxinele RTX* (denumire datorată repetării unei secvențe de 9 aminoacizi în fiecare toxină), produse de bacteriile Gram negative. Toxinele au fost grupate pe baza efectelor toxice și litice asupra celulelor gazdă ale mamiferelor. Prototipul acestei familii este *hemolizina* de *Escherichia coli*.

Hemolizina A (Hly A) de *Escherichia coli* este un factor important al virulenței în infecțiile extraintestinale, așa cum sunt cele ale tractului respirator superior, produse de *Escherichia coli*. Este reprezentantul unei familii de toxine bacteriene care necesită modificarea posttraducere pentru dobândirea activității biologice.

Hly A face parte dintr-o familie care mai cuprinde leucotoxina de *Yersinia* haemolytica, hemolizinele și leucotoxinele de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, toxina bifuncțională (adenilat-ciclază/ hemolizină) de *Bordetella pertussis* și hemolizinele de *Pseudomonas vulgaris*, *Morganella morganii* și *Moraxella bovis*, față de care există o identitate a secvenței aminoacizilor în proporție de 30–75%. Toate se maturează după sinteză și au un domeniu C-terminal care leagă $Ca^{2+}$, format din secvențele nonapeptidice repetitive bogate în glicină acidă, ceea ce a dus la denumirea RTX. Toate se exportă din celulă pe calea sistemului de secreție de tip I. Modificarea post-traducere este o caracteristică unică a acestor toxine, dar legarea $Ca^{2+}$ și secreția de tip I sunt comune și altor proteine bacteriene.

Când leagă $Ca^{2+}$, secvențele repetitive RTX formează scurte lanțuri β-pliate, organizate într-o structură neobișnuită de suprahelice-β.

Legarea $Ca^{2+}$ este o necesitate absolută pentru o activitate citotoxică și se produce după exportul proteinei. Nivelul intracelular al $Ca^{2+}$ este prea mic (0,1 uM) pentru a activa Hly A.

Toate sunt citotoxice pentru diferite tipuri de celule nucleate. Hemolizina de *Escherichia coli* lizează în câteva minute, eritrocitele diferitelor specii: șoarece, iepure, berbec, bovine, cal, om.

Hly A are 11-17 secvențe repetitive bogate în glicină.

*Sinteza.* Hly A se sintetizează ca o protoxină de 1024 de resturi, care este activată intracelular la toxina matură. Maturarea este o acilare grasă, catalizată de o moleculă co-sintetizată (Hly C). Hly C este o aciltransferază* care transferă *grupul acil* de la o proteină purtătoare (*acil-carrier protein-ACP*). Homodimerul Hly C se asociază cu acil-ACP. Lanțul acil este transferat la situsul de acilare (un rest de lizină) al pro-Hly A.

Scanned with OKEN Scanner

* Aciltransferazele bacteriene şi eucariote, în general, acceptă acil-CoA sau acil-ACP ca donori ai grupării acil, dar pentru pro-Hly A, donorul este exclusiv acil-ACP.

*Mecanismul de acţiune al Hly A*. Într-o primă etapă, toxina Hly A se adsoarbe reversibil (forţele electrostatice reversează adsorbţia), după care urmează inserţia ireversibilă în membrană. Inserţia în membrană este asociată cu schimbarea conformaţiei şi este favorizată de membranele mai fluide, cu conţinut scăzut de colesterol. După inserţie, Hly A se comportă ca o proteină integrată. Acilarea oferă puncte suplimentare de ancorare a Hly A şi favorizează contactul toxinei cu membrana. Pentru ca toxina să formeze pori membranari este necesară legarea ambelor grupări acil. Pierderea oricărui grup acil anulează activitatea citolitică a toxinei în proporţie de peste 99,5%.

Hly A produce liza celulei ţintă prin formarea porilor. Pentru multe toxine bacteriene, neînrudite cu Hly A, formarea porilor este sinonimă cu oligomerizarea a 3–100 de molecule. Hly A necesită trimerizarea moleculelor pentru producerea porilor.

Hly A are spectru larg de acţiune: lizează eritrocitele, granulocitele, monocitele, celulele endoteliale, celulele epiteliale renale de şoarece, rumegătoare şi primate. Absenţa receptorilor specifici poate să explice spectrul larg al acţiunii Hly A.

Eritrocitele expuse acţiunii Hly A de *Escherichia coli* suferă schimbări majore ale citoscheletului care se exteriorizează prin formarea proiecţiilor de suprafaţă. Liza eritrocitelor poate să semnifice eliberarea Fe, iar liza leucocitelor poate să aibă semnificaţia unui factor de virulenţă, care împiedică fagocitoza.

Adenilat-ciclaza/hemolizina de *Bordetella pertussis* are acţiune mai lentă (1–2 ore), iar activitatea leucotoxinei de *Yersinia hemolitica* este limitată la neutrofilele de la rumegătoare şi la monocitele/macrofagele primatelor.

*Salmonella typhimurium*, un patogen facultativ intracelular, produce o citolizină cu rol în virulenţă şi în supravieţuirea în interiorul macrofagului, care nu se aseamănă cu alte citolizine ale bacteriilor Gram negative. Citolizina produsă în vacuola de fagocitoză nu are rolul de a liza vacuola, pentru că *Salmonella* rămâne în fagosomul celulei. Situaţia este aceeaşi pentru citolizinele produse de *Mycobacterium, Legionella, Leishmania*.

Gena codificatoare - hly A – se găseşte la *Shigella, EIEC, Salmonella*.

Unele citolizine sunt fosfolipaze: *LLO* de *Listeria monocytogenes*, citolizinele produse de *Clostridium perfringens* şi *Pseudomonas aeruginosa* sunt fosfolipaze C, iar cea de *Corynebacterium pseudotuberculosis* este o fosfolipază D.

Fosfolipazele bacteriene cuprind un grup heterogen de proteine-enzime, care produc o varietate de efecte *in vivo* şi *in vitro*, de la alterări celulare minore în structura şi funcţia membranei citoplasmatice, până la efectul letal.

*Listeriolozina O* (LLO) produsă de *Listeria monocytogenes*, curând după ce invadează celula gazdă, mediază liza vacuolei de fagocitoză şi ieşirea bacteriei în mediul citoplasmatic. LLO aparţine unei familii de citolizine activată de gruparea

Scanned with OKEN Scanner

tiol (–SH), produse de 19 specii de bacterii Gram pozitive. Este singura toxină activată de gruparea tiol, a cărei activitate optimă este la pH-ul acid din vacuola intracelulară. pH-ul acid este declanşator al lizei vacuolei. De cele mai multe ori, mutantele LLO⁻ nu lizează vacuola şi nu trec în citosol. Gena LLO a fost transferată şi s-a exprimat la *Bacillus subtilis*, care a dobândit capacitatea de a trece în citosolul macrofagelor J 774.

*LLO* este singura toxină-enzimă din familia citolizinelor, produsă de un patogen intracelular, care are rolul de a liza fagosomul. Acidifierea conţinutului vacuolar declanşează efectul litic al LLO, limitat la membrana fagosomului.

LLO este reprezentată de două *fosfolipaze C*, cu specificitate pentru fosfatidil-inozitol şi fosfatidil-colină.

Ieşirea agenţilor patogeni de *Rickettsia* din vacuola celulei este mediată de *fosfolipaze*, care fac parte din aceiaşi familie a citolizinelor.

*Trypanosoma cruzi* invadează celulele, cu formarea vacuolelor acide intracelulare şi produce o toxină activă la pH = 5,5, în stadiile intracelulare ale ciclului. Blocarea acidifierii reduce capacitatea *Trypanosoma cruzi* de a liza vacuola şi de a trece în citosol.

### *Toxine termostabile care activează guanilat ciclaza*

Toxinele termostabile produse de *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio mimicus* acţionează prin acelaşi mecanism: activarea guanilat-ciclazei (fig. 10).

Enterotoxinele sunt proteine secretate care se leagă de un receptor celular, intră în celulă şi produc creşterea nivelului AMPc.

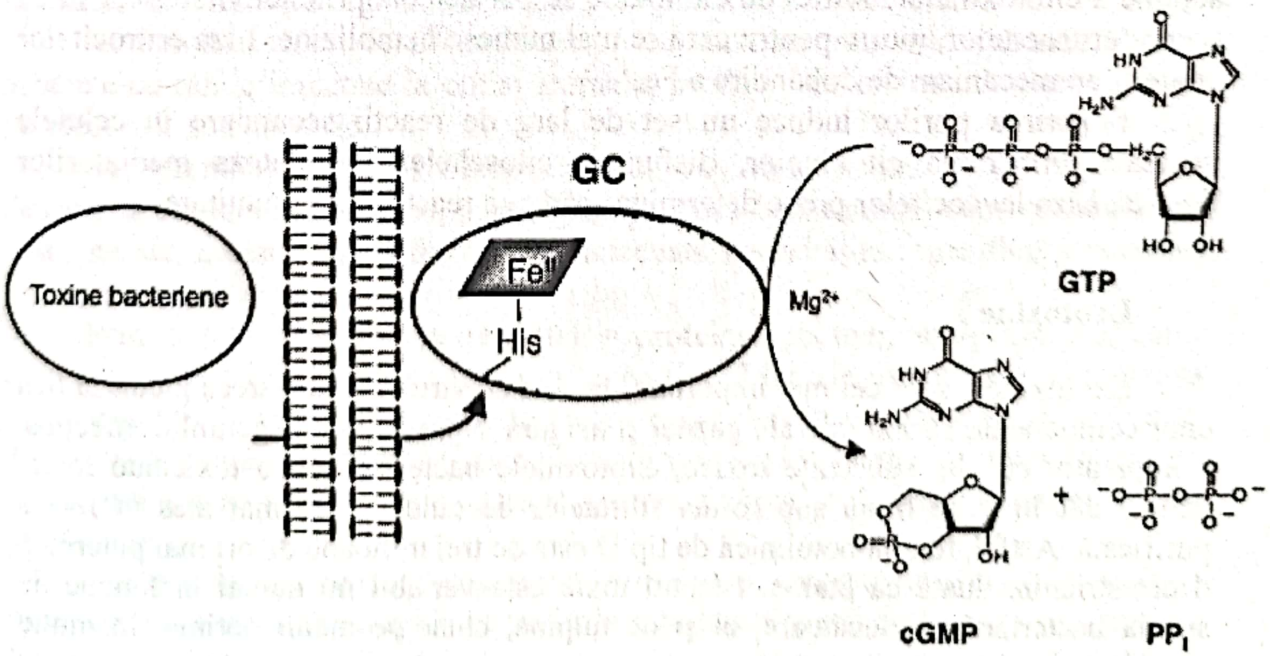



Fig. 10 – Reprezentarea schematică a modului de acţiune al guanilat-ciclazei.

Scanned with OKEN Scanner

O mare parte dintre enterotoxinele diareice se leagă la receptorii de natură glicosfingolipidică. Unele dintre aceste toxine sunt capabile să formeze canale permeabile pentru ionii de Ca, care pătrund în celulele epiteliului intestinal şi acţionează ca mesager secundar care modulează procesele de transport ionic (fig. 10). Toxinele care nu formează astfel de canale, determină, în urma interacţiuii cu receptorii specifici, eliberarea altor mesageri secundari inductori ai secreţiei ionilor de Cl, care la rândul lor antrenează secreţia ionilor de Na şi a apei, ca şi a altor anioni, ceea ce conduce la acumularea apei în lumenul intestinal, la dezechilibrarea balanţei hidro-electrolitice şi generarea diareii secretorii. Activitatea enterotoxinelor se poate evidenţia *in vitro* prin alungirea celulelor CHO (*Chinese hamster ovary*), rotunjirea celulelor Y-1 (*mouse adrenal tumor cells*) sau prin determinarea AMPc în celulele expuse acţiunii toxinei. O metodă independentă de celulele cultivate este ELISA (*enzyme-linked imunosorbent assay*). Receptorii specifici (ex. gangliozidele GM1) sunt fixate pe faza solidă pentru a lega enterotoxina, care poate fi detectată cu antiserul specific. În varianta alternativă a metodei ELISA sandwich, faza solidă constă din fragmente F (ab') 2 ale anticorpilor anti-toxină. Ambele metode au sensibilitate şi specificitate înalte. *In vivo*, pentru detectarea activităţii enterotoxinelor se foloseşte testul ansei ileale de iepure sau de şobolan.

Citotoxinele sunt definite ca proteine care omoară celulele ţintă. Ele pot acţiona intracelular sau la nivelul membranei şi formează pori. Citotoxinele cu acţiune intracelulară se leagă la nivelul receptorilor membranari şi înainte de a ajunge în citoplasmă sunt prelucrate.

Mecanismele de acţiune ale citotoxinelor sunt diferite: inhibiţia sintezei proteinelor celulare, inhibiţia formării filamentelor de actină, formarea porilor membranari.

Formarea porilor în structura membranei ţintă este un mecanism major de acţiune a citotoxinelor. Astfel de citotoxine se pot detecta prin activitatea lor litică asupra eritrocitelor, motiv pentru care se mai numesc hemolizine. Liza eritrocitelor poate fi un mecanism de dobândire a Fe.

Formarea porilor induce un set de larg de reacţii secundare în celulele nucleate: eliberarea citokinelor, disfuncţia citoscheletului, sinteza mediatorilor lipidici. Liza leucocitelor poate determina scăderea reactivităţii imunitare.

**Exotoxine**

Exotoxinele sunt cei mai importanţi factori de virulenţă, deoarece mediază liza unor componente structurale ale gazdei şi asigură supravieţuirea agentului infecţios. Comparativ cu alte substanţe toxice, exotoxinele bacteriene au o toxicitate foarte înaltă, atât în stare brută sub forma filtratelor de cultură, dar mai ales în forma purificată. Astfel, toxina botulinică de tip D este de trei milioane de ori mai puternică decât stricnina luată ca etalon. Efectul toxic este variabil nu numai în funcţie de specia bacteriană producătoare, ci şi de tulpină, chiar pe medii optime. În multe cazuri, toxigeneza se atenuează sau chiar dispare prin subcultivare repetată.

Scanned with OKEN Scanner

În general, efectul toxinelor este variabil în funcţie de natura, vârsta, greutatea, sexul şi linia genetică a animalelor pe care sunt testate, ca şi de tehnica şi calea de administrare folosite.

Datele referitoare la toxigeneză se referă la administrarea lor parenterală, deoarece cu excepţia enterotoxinelor, toxinele uzuale sunt distruse de modificările de pH sau de activitatea enzimelor digestive.

Potenţialul toxic al toxinelor este ilustrat de date teoretice:

1) toxina botulinică de tip A purificată şi cristalizată ar conţine într-un miligram, 1 200 000 DLM (doze limite mortale) pentru un kg corp cobai, ceea ce înseamnă că 1 mg de toxină poate să omoare l 200 t de cobai sau două milioane de şoareci;
2) circa 200 g neurotoxine (botulinică sau tetanică) ar putea omorî întreaga populaţie a globului.

Potenţialul toxic al toxinelor bacteriene este dependent de calea de administrare. Dozele letale pentru căile respiratorie şi digestivă sunt de 100–1000 de ori mai mari decât pentru căile intravenoasă, intramusculară, intraperitoneală sau subcutanată. Pielea intactă este o barieră eficientă faţă de toxine.

### *Toxine clostridiene*

Clostridiile sunt bacili anaerobi sporulaţi, Gram pozitivi. Unele specii cresc în prezenţa $O_2$, dar se deosebesc de speciile de *Bacillus* prin absenţa catalazei. Nu au peroxidază sau citocromoxidază, enzime cu rol în metabolismul aerob. SOD (super oxid dismutază) este prezentă la unele clostridii. Speciile de *Clostridium* trăiesc în sol, ape uzate, sedimente marine, tractul intestinal al omului şi al animalelor, în materia organică animală şi vegetală în descompunere.

Numeroase specii de *Clostridium* produc una sau mai multe toxine. Altele, asociate cu rănile infectate la om şi animale, produc o diversitate de factori toxici cu efect litic sau necrotic.

Reprezentanţii genului *Clostridium* au capacităţi invazive minime şi s-au descris ca patogeni facultativi, capabili să producă boala numai când ţesuturile au fost alterate, creându-se astfel condiţii adecvate necesităţilor specifice procesului infecţios anaerob.

Prin toxine clostridiene se înţeleg proteinele active, antigenice, a căror activitate este neutralizată cu antiseruri specifice. Efectele toxinelor se detectează prin injectare *in vivo*, în culturi de ţesuturi şi celule sau prin teste biochimice. Trăsătura dominantă a multor toxine clostridiene este letalitatea lor pentru animale. Neurotoxinele au rol patologic, care eclipsează alte particularităţi ale organismului producător.

Factorii toxici au fost desemnaţi prin litere greceşti, atribuite în ordinea descoperirii. Nu există relaţii între toxinele diferitelor specii desemnate prin aceiaşi literă, cu excepţia toxinei iota (ι) produsă de *Clostridium perfringens* şi *Clostridium*

Scanned with OKEN Scanner

*spiroforme* şi toxinele produse de *Clostridium novyi, Clostridium haemolyticum* şi respectiv *Clostridium chauvoei* şi *Clostridium septicum.* Unele toxine au fost descrise la începutul secolului XX, iar altele sunt descoperiri relativ recente.

*Clostridium tetani* este un bacil strict anaerob, Gram pozitiv şi creşte pe suprafaţa mediilor agarizate numai în condiţii anaerobe (atmosferă cu 85% $N_2$, 10% $H_2$ şi 5% $CO_2$). Celulele sunt sporulate terminal, cu spor deformant care le conferă aspectul caracteristic de rachetă de tenis. În culturile mai vechi de 24 de ore poate să apară Gram negativ. Este mobil prin flageli peritrihi. Creşterea optimă are loc la 37°C, dar scara termică de creştere este între 25–42°C. Nu fermentează glucidele, nu digeră cazeina şi nici alte proteine mai complexe. Nu produce lecitinază, nici lipază, nu reduce nitratul. Gelatina este lichefiată lent (în 7 zile). Produce $H_2S$, indol, butanol, acid acetic, propionic şi butiric. Sporii mor la 100°C, timp de 1 oră.

*Clostridium tetani* se găseşte în solul din toate regiunile globului. Este comun în materialele fecale umane şi animale.

*Clostridium tetani* sintetizează o toxină care produce tetanos, o maladie asociată rănilor, la om şi animale. Rănirile minore, care nu necesită atenţie medicală, sunt mai frecvent asociate cu tetanosul, datorită omisiunii măsurilor de protecţie.

*Clostridium tetani* are o capacitate invazivă redusă. Maladia este o toxinoză simplă: bacteria din sol, contaminantă a leziunii tisulare, se multiplică în mediul anoxigenic al plăgii şi produce *tetanospasmina*, care determină în întregime efectele patologice. Simptomele au fost descrise de Hippocrates. În 1884 s-a arătat că tetanosul se poate transmite de la omul bolnav la iepure, prin injectarea materialului din rana infectată. Implantarea granulelor de sol la şoarece, iepure şi cobai a produs simptomele tetanice.

Tetanosul este o hipertonie generalizată sau localizată a musculaturii striate, însoţită frecvent de spasme sau contracţii musculare paroxistice.

Tetanosul local se exteriorizează prin rigiditate musculară şi spasme lângă situsul rănii infectate, care de obicei progresează la tetanos generalizat, cu implicarea musculaturii striate a întregului organism. Tetanosul neonatal se datorează infecţiei restului de cordon ombilical. Severitatea tetanosului este de grade diferite: medie, cu un răspuns bun la tratamentul cu sedative şi medicamente relaxante ale musculaturii; sever, cu răspuns moderat la medicamente şi cu o rată a mortalităţii de 20–40%; foarte sever, cu răspuns slab la tratament şi cu o rată a mortalităţii de 50–90%.

Toxina tetanică acţionează prin blocarea sinapselor inhibitorii ale motoneuronilor medulari. Este blocată eliberarea mediatorilor inhibitori: acidul gama-aminobutiric şi glicina, ceea ce determină stimularea necontrolată a muşchilor.

Toxina se răspândeşte din situsul infectat prin difuzie în ţesutul muscular adiacent, prin transportul pe cale limfatică sau prin trecere pe traiectul nervilor. Din sistemul limfatic, toxina intră în sânge. Toxina se leagă de un receptor pe terminaţia nervoasă, un fragment al moleculei este preluat de terminaţia nervoasă şi este transportat spre SNC prin deplasare retrogradă, de-a lungul axonilor.

Scanned with OKEN Scanner

Perioada de incubare are o durată variabilă: de la câteva zile, la câteva săptămâni. Simptomele constau în primul rând în contracţia musculară spastică, ce poate fi letală, în funcţie de profunzimea plăgii, de situsul infecţiei şi de tratament.

*Tetanospasmina* este a doua toxină descoperită, după toxina difterică. Este o proteină termolabilă, ce poate fi inactivată prin încălzire 20 minute, la 60°C. Punctul izoelectric este 5,0–5,2. Toxina are un singur tip antigenic. Este activă sub formă monomerică (66 kDa) sau dimerică. Este o toxină intracelulară, care se eliberează după liza celulelor. După eliberarea din celulă, molecula este clivată în două fragmente polipeptidice: un lanţ greu de 100 kDa şi unul uşor, de 50 kDa, care rămân legate printr-o punte disulfurică. Clivajul este produs de proteazele celulei bacteriene. Agenţii reducători (ditiotreitol) separă cele două catene.

Papaina clivează lanţul H al toxinei bicatenare şi rezultă un fragment mare (B), alcătuit din două catene (lanţul uşor întreg şi lanţul greu scurtat) şi fragmentul mic (C) clivat din catena H. Cele două fragmente nu sunt toxice, ca şi cele două catene separate, dar fiecare precipită cu serul imun specific faţă de molecula întreagă.

Toxina pare să se lege de receptorii terminaţiei nervoase printr-o secvenţă a catenei H şi a catenei C. Afinitatea toxinei, a catenei H şi a fragmentului C pentru gangliozide sugerează implicarea structurilor gangliozdice în alcătuirea receptorilor pentru toxină.

Toxina poate fi extrasă din celule în faza exponenţială, cu soluţie salină hipertonică. Toxina legată de celulă poate exista sub forma protoxinei.

Potenţialul toxic este foarte mare: 1 mg de toxină purificată conţine $2 \times 10^8$ doze minime letale pentru şoarece.

Tetanospasmina este o neurotoxină care nu acţionează pe celule izolate sau asupra fluidelor organismului. Situsul receptor pe ţesutul nervos este un *gangliozid** hidrosolubil. Capacitatea gangliozidului de a lega toxina este dependentă de numărul de resturi de *acid sialic* şi de poziţia lor în gangliozid. Cele cu două resturi de acid sialic au cea mai mare capacitate de legare.

* *Gangliozidele* sunt sialomucolipide solubile în apă. Structural sunt alcătuite dintr-o componentă *nepolară* (ceramida), legată de o componentă *polară*, alcătuită din câteva polizaharide cu unul sau mai multe resturi de acid N-acetil-neuraminic. Gangliozidele diferă prin compoziţia jumătăţii polizaharidice. Toxina tetanică este fixată de un gangliozid a cărei componentă polară este alcătuită din două resturi de galactoză, unul de N-acetilglucozamină şi 1-3 resturi de acid N-acetilneuraminic. Legarea toxinei necesită prezenţa a cel puţin două resturi de acid N-acetilneuraminic, unite printr-o legătură sensibilă la neuraminidază.

Toxina trebuie să fie transportată pe cale sanguină sau prin spaţiile interstiţiale ale ţesutului nervos. În tetanosul local sau ascendent, toxina este absorbită de terminaţiile nervoase motorii şi se deplasează de la ţesuturi, de-a lungul trunchiurilor nervoase, spre situsul de acţiune: SNC.

În tetanosul general sau descendent, cantităţile mari de toxină care nu sunt absorbite de terminaţiile nervoase motorii, pot fi transportate de aparatul circulator sanguin sau limfatic, cu absorbţia ulterioară de către toate terminaţiile motorii. Secvenţa răspunsului spastic ale variatelor grupe de muşchi este dependentă de

Scanned with OKEN Scanner

gradul de sensibilitate al centrilor motori la tetanospasmină. Toxina injectată intravenos nu traversează bariera sânge-creier. Toxina ajunge numai în neuronii care, prin prelungiri, au conexiune directă cu periferia.

Sensibilitatea diferitelor specii de animale la tetanospasmină variază. Animalele cu sânge rece sunt rezistente, păsările sunt relativ rezistente, iar mamiferele sunt foarte sensibile. Calul este printre cele mai sensibile. Creierul animalelor rezistente leagă tetanospasmina, ca şi creierul animalelor sensibile. Diferenţele nu sunt legate de absenţa gangliozidelor care leagă toxina. Creierul de broască are o capacitate scăzută de legare a toxinei. Gangliozidul purificat din creierul de broască are aceiaşi capacitate de legare, ca şi gangliozidul din creierul mamiferelor. Dar la broască, complexul gangliozidei cu alţi constituienţi este diferit de acela din creierul de mamifer, ceea ce explică nivelul net inferior de legare a tetanospasminei.

Tetanospasmina nu are efect, dacă este administrată în cantităţi moderate prin rect, vagin, conjunctivă sau trahee, însă la doze mari poate deveni toxică după administrare pe cale orală.

*Modul de acţiune* al tetanospasminei este asemănător cu acela al stricninei. Stricnina acţionează postsinaptic şi blochează sinapsele inhibitorii (al căror mediator este glicina) în măduva spinării. Tetanospasmina acţionează în acelaşi mod, dar la nivel presinaptic (fig. 11).

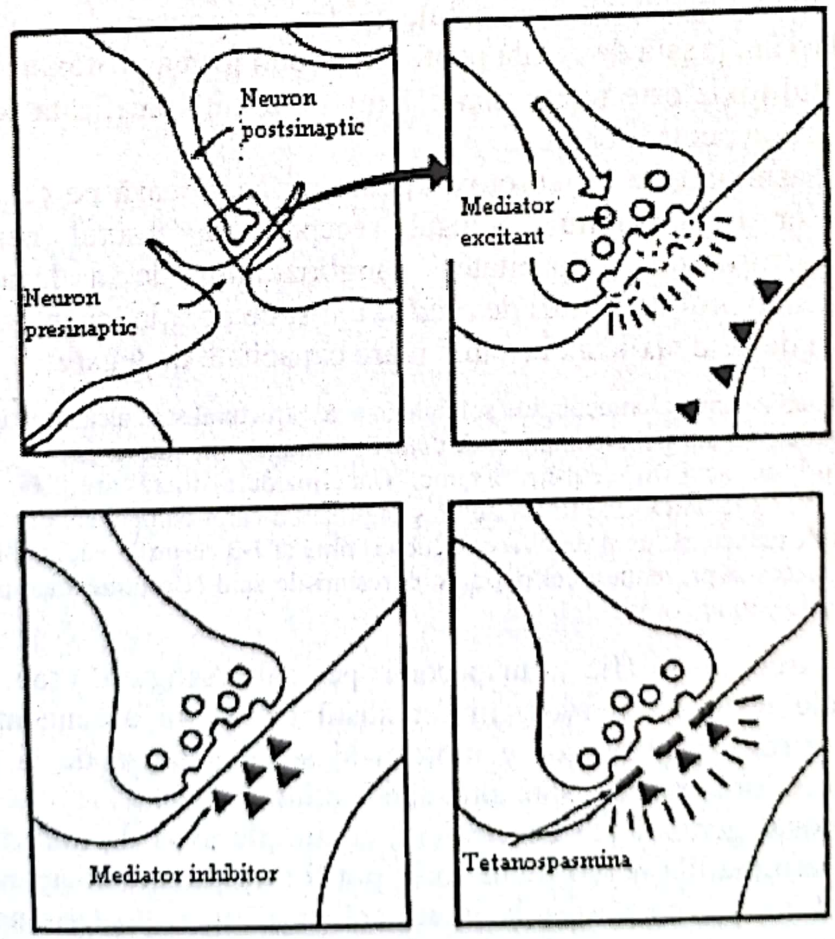



Fig. 11 – Reprezentarea schematică a mecanismului de acţiune al tetanospasminei.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatul acţiunii tetanospasminei este *paralizia spastică*. După injecţia intramusculară a tetanospasminei la iepure, urmată de administrarea la interval de două ore a serului imun specific, rezultatul este o paralizie predominant flască, asemănătoare cu cea produsă de toxina botulinică. Injectarea tetanospasminei la peştele roşu produce paralizia flască, datorită blocării transmiterii neuro-musculare la nivel periferic. Astfel, tetanospasmina produce două răspunsuri farmacologice: a) *paralizia spastică*, prin acţiunea asupra SNC şi interferenţa cu relaxarea musculară; b) *paralizia flască* a muşchilor, consecutiv acţiunii periferice directe, prin blocarea transmiterii neuro-musculare. Efectul periferic se poate produce atât la nivelul muşchilor netezi cu sinapse colinergice parasimpatice, cât şi la nivelul muşchilor striaţi.

*Paralizia spastică* convulsivă în intoxicaţia tetanică este rezultatul acţiunii toxinei asupra aparatului reflex central, care s-ar exercita prin blocarea presinaptică a eliberării mediatorilor inhibitori (glicina, GABA = acidul gama-amino-butiric). Paralizia flască pare a fi consecinţa blocării presinaptice a acetilcolinei.

Maladia naturală nu conferă imunitate, deoarece doza letală este prea mică pentru a induce răspunsul imun. Îmbolnăvirea se previne total prin imunizare activă cu anatoxina tetanică. Serul imun specific are efect profilactic dacă se administrează înainte ca toxina să se fixeze pe receptorul specific al ţesutului nervos.

*Tetanolizina* este o hemolizină produsă de *Clostridium tetani*, inactivată reversibil în prezenţa $O_2$. Este termolabilă şi este înrudită serologic cu hemolizinele $O_2$-labile produse de alte clostridii, de streptococi şi pneumococi. Acest grup de hemolizine lizează o varietate de celule: eritrocite, PMN, macrofage, fibroblaste, celule tumorale ascitice, celule HeLa, plachete. Activitatea litică este inactivată reversibil în condiţii oxidante medii: aerare, $H_2O_2$ şi reactivată de gruparea tiol din cisteină, glutation redus, tioglicolat. Toxina activă are afinitate pentru colesterol şi sterolii înrudiţi. Activitatea litică este inhibată de aceşti compuşi.

*Clostridium botulinum* produce botulismul, care este considerat ca o infecţie alimentară. Etiologia bacteriană şi natura toxică a acestei maladii s-a elucidat în 1895, cu ocazia unui focar de 50 de cazuri în Belgia, datorat consumului de jambon nepreparat termic.

Ulterior s-au înregistrat cazuri de botulism provocat de contaminarea rănilor, botulism infantil datorat absorbţiei toxinei produse de organisme toxigene care colonizează tractul intestinal al unor copii cu vârsta sub 1 an, datorită absenţei unei microbiote stabile care în mod normal inhibă germinarea sporilor ingeraţi. O sursă de spori de *Clostridium botulinum* este mierea. Botulismul este o maladie neurologică severă, caracterizată prin paralizie flască, ce afectează omul şi diferite specii de animale.

Se recunosc 3 forme de botulism, ca entităţi clinice distincte: botulismul clasic cauzat de ingestia toxinei preformate în alimente: botulismul de plagă cauzat de creşterea bacteriei şi toxigeneza în plagă; botulismul infantil cauzat de absorbţia

Scanned with OKEN Scanner

toxinei produsă de bacteriile toxigene, care colonizează tractul digestiv al copiilor mai mici de un an.

*Toxina botulinică*, sintetizată de *Clostridium botulinum* aparţine grupului toxinelor neuroparalitice şi are un potenţial toxic extrem de ridicat: circa 1 ng este letală pentru om. S-au identificat 8 variante serologice: A, B, $C_1$, $C_2$, D, E, F, G. Efectele farmacologice sunt asemănătoare.

Uneori, tulpinile de *Clostridium botulinum* produc nu numai toxina specifică de tip, ci şi o cantitate mică de toxină a altui tip (Ab, Af, Ba şi Bf).

Tipurile A, B, E şi F produc cele mai frecvente cazuri de botulism la om, iar tipurile C, D şi E produc botulism la animalele domestice şi sălbatice. Tipul G s-a izolat din sol şi nu s-a determinat ca o cauză a botulismului la om sau la animale. Toate tulpinile producătoare de neurotoxină botulinică (A-F) produc lipază, detectată ca o zonă iridescentă care înconjură colonia pe mediul cu gălbenuş de ou. *Clostridium botulinum* care produce toxina de tip G nu produce lipază şi nu fermentează glucidele.

Toxina botulinică este intracelulară şi este eliberată după liza mecanică sau enzimatică a peretelui celular. Tulpinile bacteriene neproteolitice produc toxine de tip C, D, E şi G, care îşi exprimă întregul potenţial toxic numai în prezenţa tripsinei. Tripsina clivează molecula de toxină în două polipeptide, care se separă după reducerea punţii S-S. Activarea toxinei botulinice poate avea loc în tractul intestinal, sub acţiunea enzimelor proteolitice, înainte de absorbţia în sânge.

Toxina de tip A a fost purificată şi cristalizată ca un complex cu gr. mol. 900 kDa, format din neurotoxina de 120–150 kDa şi o hemaglutinină, căreia i se atribuie rol protector faţă de enzimele tractului digestiv, înainte de absorbţia în fluxul sanguin. Neurotoxina este sensibilă la enzimele digestive şi la pH acid. Din această cauză, toxina în stare nativă, necomplexată, nu poate să producă intoxicaţia.

Toxina E este produsă sub forma unui complex format din neurotoxină şi câteva componente netoxice, cu gr. mol. 350 kDa.

Tulpinile bacteriene proteolitice au o enzimă asemănătoare tripsinei, care activează toxina.

Botulismul este cauzat de ingestia alimentelor conservate, care conţin toxina preformată, sintetizată de *Clostridium botulinum*. Cazurile de botulism asociat cu rănirea se datorează multiplicării bacteriei în ţesutul lezat şi producerii toxinei. Perioada de incubaţie prelungită între momentul ingestiei alimentului suspectat şi apariţia simptomelor a generat teoria toxiinfecţiei: *Clostridium botulinum* ingerat se multiplică în tractul intestinal şi eliberează toxina.

*Structura.* Neurotoxinele botulinice sunt proteine care constau din două catene polipeptidice, de 100 şi respectiv de 50 kDa, legate printr-o punte S-S. Cele două catene sunt sintetizate ca un singur polipeptid cu activitate biologică relativ scăzută. Polipeptidul este clivat de de o protează şi se formează molecula bicatenară, foarte activă.

Scanned with OKEN Scanner

În supernatantul culturii, neurotoxinele sunt complexate cu proteine netoxice. În complex, toxina este stabilă în special la pH acid (3,5–6,5), dar la pH alcalin complexul se disociază şi toxina îşi pierde parţial activitatea. Neurotoxina poate fi separată de componentele netoxice şi se purifică prin cromatografia de schimb ionic.

*Paralizia.* Indiferent de modul în care toxina botulinică dobândeşte acces în organism (ingestia toxinei preformate sau producerea ei într-o rană sau în tractul gastrointestinal), mecanismul paraliziei este identic. Toxina se leagă de receptorii terminaţiilor nervoase periferice, blocând sinapsele cu fibrele musculare (fig. 12).

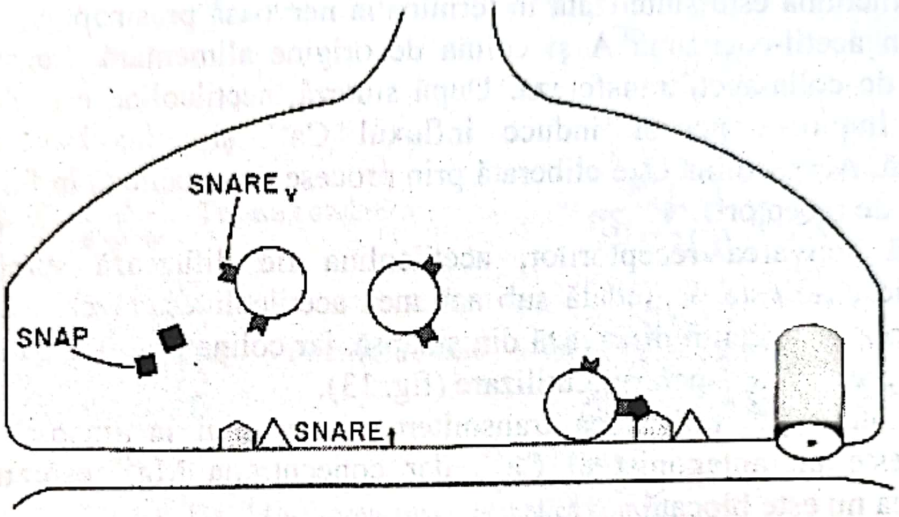



Fig. 12 – Reprezentarea schematică a modului de acţiune al toxinei botulinice (SNAP = proteine asociate sinaptosomului, SNARE = receptori asociaţi sinaptosomului; cilindrul reprezintă canalul de Ca).

După legare, o porţiune a moleculei de toxină este internalizată printr-un proces necunoscut şi blochează eliberarea acetilcolinei din terminaţia nervoasă. Astfel, răspunsul muşchiului la impulsul nervos este blocat, deoarece neurotransmiţătorul nu mai este eliberat pentru a excita muşchiul.

Mecanismul intoxicaţiei este acelaşi, indiferent de forma de botulism: din tractul intestinal sau din rana infectată, toxina este absorbită în mediul intern şi prin sânge este transportată la nivelul terminaţiilor nervoase. Toxina de tip A are cea mai mare afinitate pentru ţesutul nervos.

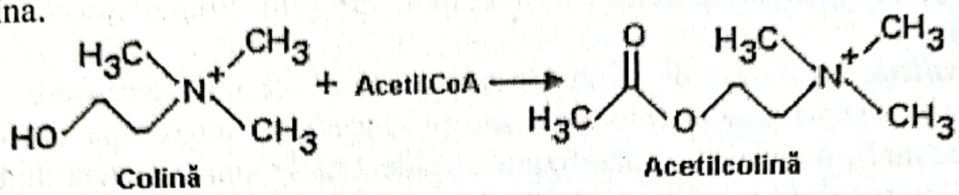
Toxina botulinică se deosebeşte de tetanospasmină, prin aceea că acţionează *periferic*: se fixează la nivelul sinapselor neuroefectoare şi blochează transmiterea impulsului.

Toxina botulinică produce *paralizia flască* a muşchilor, dependenţi de sistemul nervos vegetativ, care interferă cu respiraţia şi produc asfixia. Toxina acţionează specific asupra sistemului nervos periferic. SNC nu pare să fie afectat, probabil datorită barierei sânge-creier sau datorită lipsei receptorilor pentru toxină.

Toxina se leagă specific la joncţiunea neuro-musculară şi produce paralizia completă a fibrelor nervoase colinergice. Acetilcolina este mediatorul următoarelor

Scanned with OKEN Scanner

trei tipuri de fibre: terminaţiile fibrelor preganglionare simpatice şi parasimpatice; terminaţiile postganglionare parasimpatice; terminaţiile ce inervează muşchii striaţi. Toxina botulinică pare să paralizeze numai sinapsele care au ca mediator acetilcolina.




Colină Acetilcolină

Acetilcolina este sintetizată în terminaţia nervoasă presinaptică, din acetatul derivat din acetil-coenzima A şi colina de origine alimentară. Legarea lor este catalizată de colin-acetiltransferază. După sinteză, acetilcolina este depozitată în vezicule. Impulsul nervos induce influxul $Ca^{2+}$ şi efluxul veziculelor cu acetilcolină. Acetilcolina este eliberată prin procese de exocitoză în fanta sinaptică şi se leagă de receptori.

După activarea receptorilor, acetilcolina fie difuzează spre membrana postsinaptică, fie este degradată sub acţiunea acetilcolinesterazei şi convertită la acetat şi colină. Acetatul difuzează din sinapsă, iar colina este pompată din nou în terminaţia presinaptică pentru reutilizare (fig. 13).

Ionii de $Mg^{2+}$ pot bloca transmiterea impulsului la sinapsa colinergică, deoarece este un antagonist al $Ca^{2+}$, dar concentraţia $Mg^{2+}$ este inferioară şi transmiterea nu este blocată.

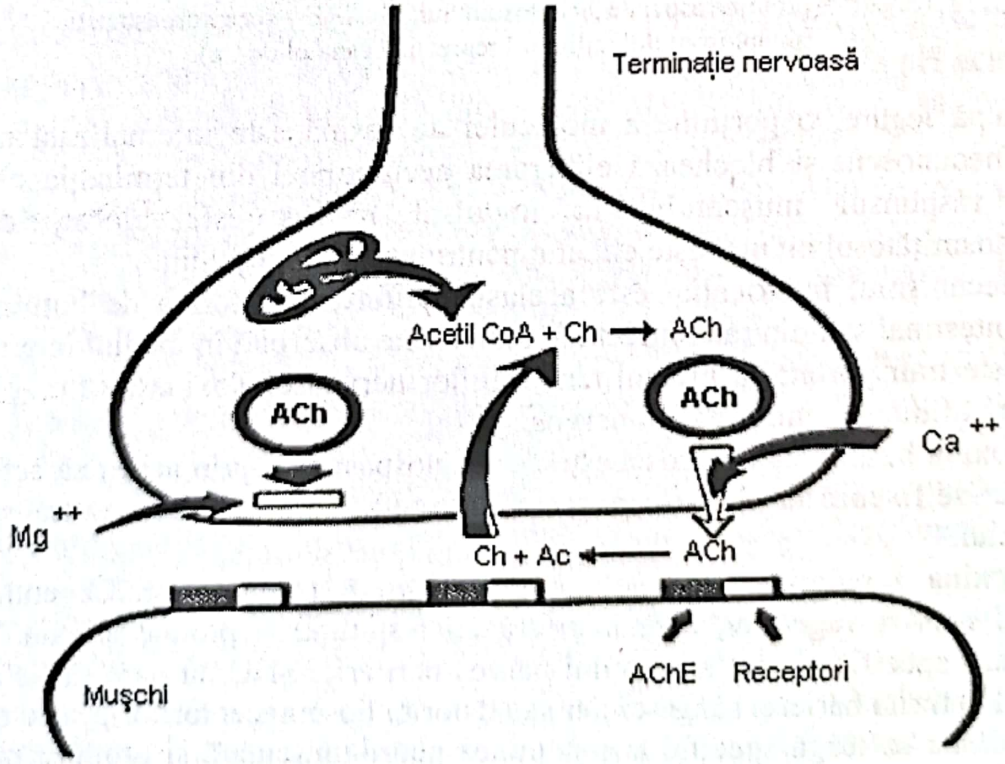



Fig. 13 – Ilustrarea schematică a metabolismului acetilcolinei la joncţiunea neuromusculară.

Scanned with OKEN Scanner

Neurotoxina botulinică acţionează prin *blocarea eliberării acetilcolinei* la joncţiunea neuromusculară. Situsul acţiunii este componenta *presinaptică*, unde inhibă eliberarea acetilcolinei prin următoarea succesiune de evenimente: moleculele de toxină se leagă de receptorii pe terminaţia nervoasă; molecula de toxină sau o porţiune a acesteia este internalizată; în prelungirea nervoasă, toxina interferă cu eliberarea acetilcolinei (fig. 14).

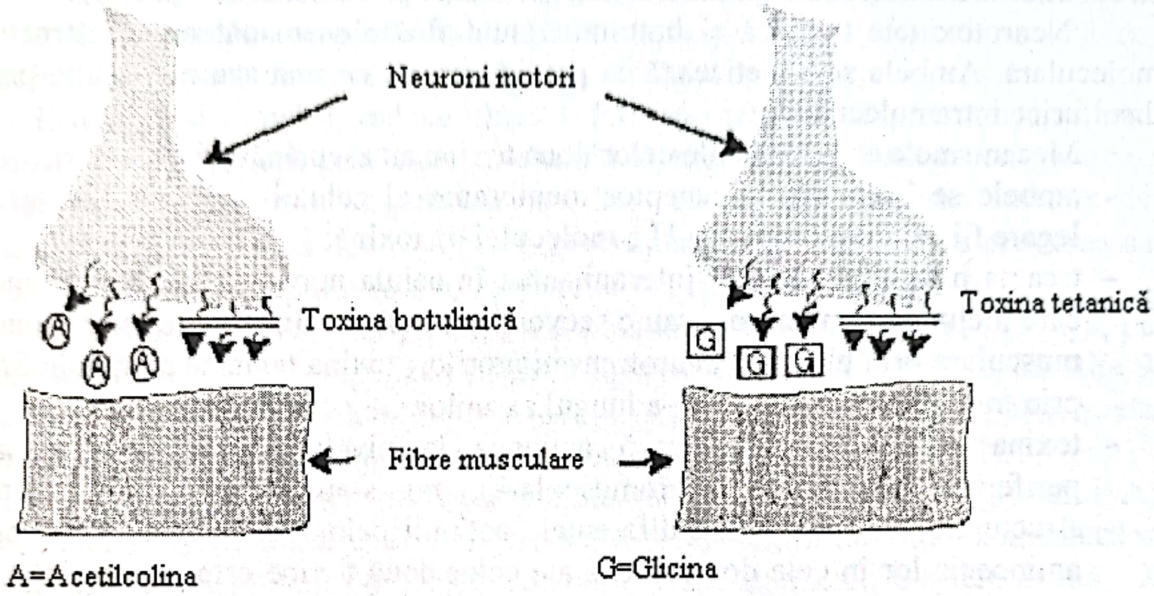



Fig. 14 – Prezentarea schematică comparativă
a modului de acţiune al toxinelor botulinice şi tetanice.

Mecanismul blocării eliberării acetilcolinei s-a elucidat recent: porţiunea activă a toxinei care intră în terminaţia nervoasă are activitate *peptidazică* specifică pentru proteinele ce formează structurile veziculare ce conţin mediatorul sinaptic şi au rol în exocitoză. Acţiunea toxinei previne exocitoza mediatorului sinaptic (acetilcolina) şi propagarea potenţialului de acţiune.

Perioada de incubaţie este dependentă de doză: câteva ore până la câteva zile, după care apar dificultăţi ale actului deglutiţiei şi respiraţiei, diplopie, paralizia extremităţilor.

Antiserul specific administrat timpuriu, înainte ca toxina să se fixeze pe receptorii ţesutului nervos, se foloseşte în scop terapeutic. *Guanidina*, administrată în scop terapeutic, acţionează presinaptic şi stimulează eliberarea acetilcolinei din terminaţiile nervoase, iar monoacetatul germinal (din seminţe încolţite) acţionează postsinaptic şi creşte tonusul muscular prin conversia potenţialului unic de acţiune cauzat de un singur impuls nervos, într-o cascadă de potenţiale repetitive.

Recuperarea funcţiei nervoase la nivelul sinapselor afectate de neurotoxina botulinică necesită formarea unor noi plăci neuromotorii.

Utilizarea acţiunii selective a toxinei botulinice în scop terapeutic este o direcţie atrăgătoare de investigaţie farmacologică. Specificitatea şi caracterul ireversibil al acţiunii toxinei botulinice s-a folosit cu succes pentru tratamentul

Scanned with OKEN Scanner

unor dezordini neuromusculare: strabism şi blefarospasm (spasmul muşchilor pleoapelor), spasmul hemifacial, disfonia spastică, torticolis spasmodic (contracţia spastică a muşchilor gâtului). Cantităţi foarte mici de toxină se folosesc pentru a bloca răspunsul muscular faţă de impulsurile nervoase care produc disfuncţii. În aceste cazuri, ireversibilitatea acţiunii toxinei este ideală, pentru că efectul terapeutic poate să persiste câteva săptămâni după fiecare injecţie. În timp, efectele terapeutice ale toxinei sunt anulate, datorită sintezei proteinelor de înlocuire.

Neurotoxinele tetanică şi botulinică sunt foarte asemănătoare ca structură moleculară. Ambele se sintetizează ca peptide unice, cu una sau mai multe punţi disulfurice intramoleculare.

Mecanismele de acţiune ale celor două toxine au asemănări şi deosebiri:

- ambele se leagă pe un receptor membranar al celulei nervoase, situsul de legare fiind situat pe catena H a moleculei de toxină;
- treapta paralitică necesită internalizarea în celula nervoasă, a unui fragment care include catena uşoară sau o secvenţă a acesteia; ambele produc disfuncţii musculare prin blocarea neurotransmiţătorilor; toxina tetanică ajunge în SNC prin transportul retrograd de-a lungul axonilor;
- toxina botulinică îşi exercită acţiunea la nivelul terminaţiei nervoase periferice (joncţiunea neuromusculară); nu s-au identificat diferenţele structurale care determină diferenţele acţiunii celor două toxine. Omologia aminoacizilor în cele două catene ale celor două toxine este remarcabilă. Se consideră că genele codificatoare au evoluat dintr-o genă ancestrală comună.

Toxina tetanică şi cea botulinică de tip G sunt codificate de gene plasmidiale; toxinele C şi D botulinice sunt codificate de gene fagice.

Toxina botulinică, datorită duratei mari de acţiune, s-a dovedit a fi un instrument de investigaţie în trei domenii de cercetare: localizarea terminaţiilor nervoase colinergice; studiul mecanismului eliberării acetilcolinei; analiza efectelor trofice ale nervilor asupra muşchilor.

*Histotoxinele*

Infecţiile clostridiene ale plăgilor (produse prin leziuni tisulare mecanice profunde şi contaminate cu granule de sol) se împart în trei categorii: contaminări simple ; celulita anaerobă ; mionecroza clostridiană (gangrena gazoasă).

În *contaminările simple*, una sau mai multe specii de *Clostridium* se găsesc în ţesutul lezat, dar nu invadează ţesuturile înconjurătoare. Uneori progresează la condiţia patologică de *celulită anaerobă*, caracterizată prin infecţia şi necroza ţesutului traumatizat, fără ca ţesutul sănătos să fie afectat. Speciile care produc celulita pot fi proteolitice şi din această cauză, rana poate avea culoarea brună. Nu se produc toxine. *Mionecroza* implică invazia muşchiului sănătos, care nu fusese avariat de traumă sau de ischemie. În stadiul terminal se instalează starea de prostraţie, apatie, şocul ireversibil. Probabil, sfârşitul letal se datorează intoxicaţiei cronice şi efectului direct al toxinelor asupra organele vitale. Cele mai multe

Scanned with OKEN Scanner

mionecroze sunt produse de *Clostridium perfringens*, *Clostridium novyi* şi *Clostridium septicum*. Nici una dintre specii nu este foarte invazivă. De fapt, aceste specii sunt saprobionte, dar produc toxine necrozante, lecitinazice, hemolitice.

*Clostridium perfringens* (denumirea veche – *Clostridium welchii*) intră în compnenţa microbiotei intestinale a omului şi animalelor. Sporii sunt rari şi nu apar în culturile care cresc pe mediile obişnuite. Creşte la temperaturi cuprinse între 20 şi 50°, cu un optim la 45°. Coloniile pe agar-sânge au contur dublu: o zonă clară internă de hemoliză completă datorată toxinei θ şi o zonă externă neclară de hemoliză incompletă datorată toxinei α.

Este un bacil imobil, reduce nitratul, fermentează glucoza, lactoza, manoza, sucroza etc. şi lichefiază gelatina. Lactoza din lapte este fermentată cu coagulare şi producere de gaz, dar nu digeră cazeina. Se izolează uşor dintr-un amestec de bacterii, prin incubare la 45° (t° optimă de creştere), ceea ce permite creşterea sa abundentă, datorită timpului scurt de generaţie (8 minute).

*Clostridium perfringens* produce 4 toxine letale majore (α, β, ε, ι (iota)) , pe baza cărora speciile se grupează în cele 5 tipuri toxigene: A, B, C, D, E. Alte 9 toxine minore (antigene solubile) pot avea rol în patogeneză: δ, θ, k, λ, μ, ν, γ, eta şi *neuraminidaza*. *Enterotoxina* poate cauza intoxicaţii alimentare.

Cele mai importante pentru infecţiile de plagă sunt liniile grupului A, prezente în sol şi în conţinutul intestinal uman şi animal, în absenţa manifestărilor clinice. Ele produc toxina α (fosfolipază C), *k* (colagenază), θ (hemolizină), λ (protează)şi ν (DN-ază). Tipurile B, C, D, E nu rezistă în sol şi par a fi obligat parazite. Se găsesc în tractul intestinal al animalelor domestice, iar prezenţa lor la om este asociată cu boala.

Cea mai importantă toxină produsă de tulpinile A de *Clostridium perfringens* este *toxina* α. Este o *fosfolipază C* dependentă de Ca (o lecitinază). Este o metaloprotează cu Zn, de 53 kDa, ce hidrolizează lecitina asociată cu membrana celulară şi complexele fosfolipidice sanguine, eliberând fosforil-colina şi digliceride. α-toxina determină reacţia pozitivă pentru lecitinază pe mediul cu gălbenuş de ou şi produce o hemoliză incompletă pe agar-sânge.

*In vivo*, *α-toxina* produce hemoliza intravasculară, agregare plachetară, leziuni capilare, liza leucocitelor. Produce hipotensiune şi bradicardie, rezultatul final fiind adeseori şocul. Ionii de Ca, care condiţionează activitatea fosfolipazei C pot avea rolul de a conferi sarcină pozitivă miceliilor de lecitină. Activitatea toxinei este inhibată de fosfat sau de alte substanţe care leagă Ca. Activităţile hemolitică şi hidrolitică ale fosfolipazei C s-au disociat prin încălzire la 56°C, în prezenţa ionilor de Ca. Activitatea hemolitică este inhibată, iar cea hidrolitică se păstrează. Este factorul major al mionecrozei din gangrena gazoasă.

Acţiunea *α-toxinei* este influenţată de calea de administrare. Injectarea intravenoasă lizează plachetele, urmată de hemoliză masivă, cu scăderea numărului de eritrocite până la 5–20% în câteva ore. 90% din toxina injectată intravenos dispare în 5 minute, iar cea care rămâne în sânge are afinitate mai mare pentru

Scanned with OKEN Scanner

fosfolipidele plasmei decât pentru cele eritrocitare. După 15 minute se produce hemoliza intravasculară. Toxina nelegată de fosfolipidele plasmei se localizează în ficat şi mai puţin în plămâni, rinichi, splină. Toxina injectată intramuscular pare să nu treacă în sânge şi produce efecte locale.

*Toxina*-β este o toxină letală majoră produsă de tulpinile B şi C de *Clostridium perfringens*. Produce leziunile enteritei necrotice la pacienţii cu un nivel scăzut al dietei proteice. Pacienţii au nivel scăzut al activităţii proteazelor digestive, fiind blocate de inhibitorii din cartoful consumat tradiţional în cantităţi mari la sărbătorile din Noua Guinee, împreună cu carnea de porc cu rol de sursă a agentului infecţios.

*Toxina*-ε este produsă de tulpinile de tip B şi D. Este sintetizată ca o protoxină cu toxicitate minimă, convertită la forma de peste 1000 de ori mai activă după clivarea proteolitică a secvenţei N-terminale sub acţiunea proteazelor bacteriene sau sub acţiunea tripsinei. Protoxina conţine 311 aminoacizi. Activarea protoxinei corespunde ruperii legăturii peptidice între aminoacizii 14–15 de la capătul N şi eliberarea „peptidului de activare" de 14 aminoacizi.

Toxina afectează în primul rând intestinul, producând creşterea permeabilităţii peretelui intestinal, cu creşterea înglobării toxinei, care acţionează sistemic ca o toxină letală. După intrarea în circulaţie produce hiperemie renală, edem pulmonar, exces de lichid pericardic.

*Toxina iota* este sintetizată de tulpinile E de *Clostridium perfringens* izolate din intestinul de viţel cu semnele enteritei şi ale intoxicaţiei generale. Este alcătuită din două proteine, distincte biologic şi imunologic (iota-a şi iota-b). Activitatea toxică este produsă de amestecul celor două proteine. Iota-b are rol de legare, iar iota-a pătrunde în citosolul celulelor sensibile: actina globulară a muşchilor striaţi şi actina nemusculară sunt ADP-ribozilate. Este dermonecrotică şi letală pentru şoarece.

*Clostridium perfringens*, component al microbiotei intestinale poate produce *enterotoxemia** la om şi animale, după ingestia unui număr mare de celule vii sau după ingestia alimentelor contaminate. Se multiplică în intestin şi toxina sau toxinele ating repede un nivel suficient de crescut pentru a fi absorbite în sânge. Enterotoxemia este produsă de enterotoxine, β-toxină şi toxina ε. Ultima măreşte permeabilitatea intestinală, ceea ce permite absorbţia rapidă a toxinei din lumen. Are afinitate mare pentru ţesutul nervos şi rinichi, unde produce edem şi necroză.

* Enterotoxemia semnifică o creştere accentuată a permeabilităţii barierei intestinale, consecinţa fiind tranzitul unei cantităţi crescute de toxine, din lumen în mediul intern.

Enterotoxemia asociată cu intoxicaţia alimentară produsă de *Clostridium perfringens* are un caracter particular, deoarece toxina nu se sintetizează în timpul creşterii vegetative, ci numai în timpul sporulării. Toxina se acumulează în sporangiul celular şi se eliberează numai după liza sporangiului şi eliberarea sporului matur. Toxina pare a fi o proteină structurală a învelişului sporal.

În cele mai multe cazuri de intoxicaţii alimentare, se consideră că celulele vii de *Clostridium perfringens* sunt ingerate odată cu alimentele, ajung în intestin,

Scanned with OKEN Scanner

sporulează şi se lizează eliberând enterotoxina. Argumentul major împotriva toxinei preformate este că, în produsele alimentare, bacteria sporulează puţin sau de loc.

Tulpinile de *Clostridium perfringens* care sintetizează toxina β în cantitate mare sunt asociate cu *enterita necrozantă*. Toxina produce paralizia locală a mişcărilor intestinale, urmată de inflamaţie, hemoragie, necroză gangrenoasă focală, în special în jejun.

*Enterotoxina* (CPE) este o proteină oligomerică de 35 kDa şi punctul izoelectric la pH 4,3, produsă de tulpinile de tip A, C şi D. Este un peptid cu 309 amioacizi, cu un grup sulfhidril liber. În anumite condiţii CPE formează un complex de circa 155 kDa, care ar corespunde unui por ce alterează permeabilitatea membranei. Activitatea enterotoxinei creşte de câteva ori după tratamentul cu tripsină. Tripsina clivează la două situsuri, fiecare cu un rest de lizină, clivând două peptide de 15 şi respectiv de 10 aminoacizi. Toxina tripsinizată constă dintr-o catenă de 284 de aminoacizi şi cele două peptide asociate, care nu se separă de catena majoră decât în prezenţa SDS. Aminoacizii din regiunea 45–116 sunt esenţiali pentru activitatea toxinei, mediind interacţiunea acesteia cu ocludina, o proteină de 65 kDa situată la nivelul joncţiunilor strânse. Receptorii sunt necunoscuţi.

Modul de acţiune al enterotoxinei de *Clostridium perfringens* este asemănător cu al enterotoxinei holerice şi al enterotoxinei β de *Staphylococcus*: produce creşterea permeabilităţii capilarelor, vasodilataţie şi creşterea motilităţii intestinale.

Enterotoxina se leagă de receptorii de suprafaţă ai celulelor epiteliale intestinale. Legarea este urmată de inserţia întregii molecule în membrană, fără internalizare. Se produce o schimbare bruscă a fluxului ionic, care influenţează metabolismul şi sinteza macromoleculelor, creşte nivelul $Ca^{2+}$ intracelular, iar transportul apei, Na şi Cl este inversat, de la absorbţie spre secreţie. Se pierde lichidul celular, ionii şi moleculele de până la 3,5 kDa. Toxina are activitate maximă în ileum, moderată în jejun şi este inactivă în duoden.

*Toxinele minore* produse de *Clostridium perfringens* au rol în patogeneză, datorită capacităţii lor de a degrada ţesuturile.

δ-*toxina* este o hemolizină produsă de tulpinile B şi C. Este hemolitică pentru eritrocitele de berbec, capră, porc. Activitatea este inhibată de gangliozide ($GM_2$), dar nu şi de alţi compuşi lipidici (sfingomielină, lecitină, colesterol).

*Toxina k* este o *colagenază* cu activitate gelatinică. Are specificitate de substrat. *In vivo*, enzima hidrolizează regiunile nepolare ale moleculei de colagen, caracterizate prin secvenţa $(Gly\text{-}Pro\text{-}R)_n$ (R= rest de aminoacid). La cobai, după injectare subcutană sau intramusculară, toxina purificată atacă ţesutul conjunctiv din tegument şi de suport al ţesutului muscular, rezultatul fiind distrugerea litică a muşchiului.

*Toxina* θ (perfringolizina O) produce o zonă de hemoliză clară pe agar-sânge, este o *hemolizină* termolabilă, histotoxică şi letală, labilă în prezenţa $O_2$, dar poate fi activată în prezenţa agenţilor reducători. Adsorbţia toxinei θ pe eritrocit este

Scanned with OKEN Scanner

dependentă de starea redusă. Streptolizina O, pneumolizina, tetanolizina şi toxina θ dau reacţii imune încrucişate (antiserul faţă de una dintre ele le neutralizează şi pe celelalte 3). Toate sunt hemolizine $O_2$-labile, al căror grup prostetic poate fi comun. Spre deosebire de α-toxină, care are specificitate de specie, toxina θ lizează eritrocitele tuturor speciilor investigate, cu excepţia celor de şoarece.

*Toxina* λ este o *protează nespecifică* care hidrolizează gelatina, dar nu atacă colagenul nativ, motiv pentru care se distinge de colagenază. Rolul ei ar fi acela de a hidroliza ţesutul mort la locul infecţiei.

*Toxina* ν este o *DN-ază* termolabilă. Nu are activitate hemolitică sau necrozantă, dar distruge leucocitele şi alte celule nucleate, prin depolimerizarea ADN.

În infecţiile cu *Clostridium perfringens*, rolul fundamental în patogeneză îl are *fosfolipaza C*. Colagenaza, proteaza nespecifică, hemolizina şi DN-aza produc modificări ale ţesutului infectat. Acţiunea toxinelor produce *edemul*, care diminuă fluxul sanguin şi potenţialul redox al ţesutului, urmat de necroză. Aceste modificări uşurează creşterea agentului infecţios şi răspândirea infecţiei în ţesutul înconjurător.

*Neuraminidaza* (sialidaza) este un factor de patogenitate al multor microorganisme. Acţiunea sa asupra eritrocitelor le face aglutinabile, creşte vâscozitatea sângelui şi favorizează tromboza capilară. Este formată dintr-un singur lanţ polipeptidic de 64 kDa. La focusare izoelectrică relevă 5 componente, fiecare cu pH izoelectric distinct. După denaturare cu SDS sau uree 8M, diferenţele dispar şi polipeptidul are pH izoelectric la 4,3.

*Clostridium novyi* (*Clostridium oedematiens*) se întâlneşte cu o frecvenţă de 40–60% în rănile infectate şi este asociat cu gangrena gazoasă. În funcţie de capacitatea de a produce diferite toxine, tulpinile sale aparţin la 3 grupe toxigenice: A, B, C.

*Clostridium haemolyticum* se aseamănă cu *Clostridium novyi*, fiind considerat chiar ca varianta D a acestuia.

Cele două specii produc toxine cu unele specificităţi antigenice comune, îngreunând considerabil diferenţierea pe baze serologice.

*Toxina* α-necrozantă este principalul factor patologic şi letal. Toxina β este letală, hemolitică, necrozantă şi are activitate lecitinazică de fosfolipază C. Toxina γ este tot o fosfolipază C, dar se distinge serologic de toxina β. Toxina δ este o hemolizină $O_2$-labilă. Toxina *zeta* este o hemolizină, insensibilă la $O_2$. Toxina ε este o lipază care determină aspectul perlat al coloniilor pe mediul agarizat cu gălbenuş de ou. Descompune trigliceridele şi digliceridele. Toxina *eta* este o enzimă proteolitică, activă faţă de miozina şi tropomiozina din muşchi.

*Clostridium septicum* şi *Clostridium chauvoei* sunt organisme asemănătoare, care se deosebesc prin manifestările clinice pe care le determină. *Clostridium septicum* este cea de-a treia specie importantă, asociată cu gangrena gazoasă.

*Clostridium septicum* produce o maladie a oilor denumită *braxy**, caracterizată prin infecţia mucoasei şi a submucoasei abomasum, multiplicare cu bacteriemie şi toxemie fatală în câteva ore de la apariţia simptomelor.

Scanned with OKEN Scanner

* Braxy este o maladie acută, de obicei fatală a mieilor şi oilor tinere, ale cărei simptome sunt febra, anorexia, inflamaţia peretelui abomasum şi toxemia. Maladia apare numai iarna şi se poate datora invaziei abomasum cu *Clostridium septicum*. Ingestia vegetalelor îngheţate este un posibil factor predispozant. Moartea se produce în câteva ore de la apariţia simptomelor.

*Clostridium chauvoei* produce infecţii endogene netraumatice la cornute, deoarece infecţia ţesutului muscular se produce în absenţa leziunii externe. toxina α, cu efect letal, necrozant, hemolitic şi leucocidic; toxina β, o DN-ază; toxina γ, o hialuronidază (o enzimă care hidrolizează legăturile glicozidice dintre resturile de N-acetilglucozamină şi acid glucuronic ale acidului hialuronic); toxina δ, o hemolizină labilă la $O_2$, asemănătoare celor produse de alte specii de *Clostridium*. Este neutralizată de serul anti-streptolizină O.

Unele dintre toxinele produse de cele două specii sunt identice, iar altele se deosebesc pe baze serologice.

*Clostridium histolyticum* este o bacterie comună în sol, rareori asociată cu gangrena gazoasă, dar poate fi un component al unui amestec virulent, de exemplu poate fi implicată în asociaţie cu *Clostridium perfringens* în etiologia gangrenei gazoase. Produce colagenaze şi alte enzime proteolitice, unice prin eficienţa lor de a hidroliza proteinele tisulare până la peptide şi aminoacizi. Frecvenţa redusă a izolării s-ar putea datora dificultăţilor de cultivare. Nu este strict anaerob (creşte pe mediile agarizate chiar în prezenţa aerului), dar este inhibat de glucoza din mediu, iar rezistenţa termică a sporilor este redusă. Nu fermentează glucidele, dar este proteolitic. Nu formează alţi acizi, cu excepţia acidului acetic.

*Clostridium histolyticum* produce cel puţin 5 toxine-enzime:

– α-*toxina* necrozantă şi letală produce moartea animalelor în 24 de ore de la injecţia intramusculară. Tegumentul şi muşchii adiacenţi zonei injectate sunt complet lizaţi;
– β-*toxina* cu efecte colagenazice. Este o metaloprotează care clivează colagenul nativ triplu-helix şi gelatina. Pe baza proprietăţilor fizice s-au identificat 7 variante de colagenaze:
– γ-*toxina*, o protează activată de gruparea tiol, ce digeră gelatina, cazeina, dar este inactivă faţă de colagen;
- δ-*toxina*, o enzimă proteolitică cu actvitate elastazică, inactivată reversibil în prezenţa agenţilor reducători;
- ε-*toxina*, o hemolizină labilă la $O_2$, asemănătoare serologic cu cele produse de alte clostridii.

*Clostridium difficile* este un component al microbiotei normale a intestinului la copii şi la un procent mic de adulţi. Lichefiază gelatina, dar nu este proteolitic. Fermentează fructoza, glucoza, manitolul, manoza şi xiloza. Este negativ pentru lecitinază şi lipază şi produce un amestec de acizi (acetic, butiric, izobutiric, valeric, izovaleric, izocaproic, formic şi lactic în mediul cu extract de levuri şi glucoză).

S-a izolat pentru prima dată dintr-o colită pseudomembranoasă (PMC) umană, post-antibiotică, şi ulterior maladia a fost reprodusă la hamster, cobai,

Scanned with OKEN Scanner

iepure, după administrarea antibioticelor. Microbiota bacteriană normală este bariera majoră protectoare faţă de colonizarea cu agenţi patogeni. Dacă microbiota este perturbată, gazda devine sensibilă la colonizare cu specii alohtone sau la multiplicarea masivă a unor specii indigene condiţionat-patogene. Utilizarea antibioticelor creează condiţii predispozante la PMC, deoarece inhibă dezvoltarea microbiotei normale, creind un dezechilibru numeric al speciilor componente, stare denumită *disbioză*. Orice antibiotic poate induce PMC, dar clindamicina are cel mai înalt potenţial.

*Clostridium difficile* este toxigen *in vitro* şi *in vivo* şi produce două toxine cu potenţial letal: o *enterotoxină* (toxina A – de 400–600 kDa) şi o *citotoxină* (toxina B – de 360–500 kDa). Ambele determină efecte letale după injectare subcutanată sau intramusculară la şoarece, hamster şi maimuţa Rhesus, iar *in vitro* determină efecte citopatice asupra celulelor animale şi umane. Cele două toxine se găsesc în supernatantul culturilor de *Clostridium difficile* şi se purifică din filtratul culturii.

Toxina A se leagă de gangliozidul $GM_1$ al bordurii în perie a enterocitului şi este la fel de activă ca şi toxina holerică. *In vitro*, efectul s-a evidenţiat asupra ansei ileale de iepure, iar *in vivo* toxina determină efectul enterotoxic: la iepure produce infiltrarea neutrofilelor în ileum şi eliberarea mediatorilor inflamatorii, alterarea permeabilităţii membranare, secreţia fluidelor şi necroză hemoragică. Lichidul hemoragic care se acumulează în ansele ileale tratate cu toxina A, conţine niveluri crescute de albumină. Toxina B are acţiune predominant citotoxică şi este mai puternică decât toxina A. Produce rotunjirea celulelor datorită inducerii depolimerizării filamentelor de actină şi dezorganizării citoscheletului, cu creşterea cantităţii de actină globulară. Ambele toxine produc rotunjirea celulelor în cultură şi ambele sunt active faţă de toate tipurile de celule testate, ceea ce denotă existenţa unui mecanism comun de acţiune. Efectul de rotunjire se produce după tratamentul celulelor cu citocalazină B, un metabolit fungic care acţionează asupra microfilamentelor, dar efectul este reversibil. Efectul toxinei B este ireversibil.

*ADP-riboziltransferaza* modifică actina celulară, ca şi toxina iota de *Clostridium perfringens*. Această enzimă transferă componenta ADP a NAD, la actina nemusculară, dar nu la actina muşchiului scheletic, pe care o ataşează printr-o legătură N-glicozil, la Arg-177 a moleculei de actină.

Activitatea ADP-ribozilantă a toxinelor clostridiene oferă explicaţia moleculară a efectului lor asupra celulelor.

Toxinele produse de clostridii sunt antigenice şi au activităţi biologice demonstrabile. Multe dintre cele enumerate sunt comune pentru mai multe specii: neurotoxinele, toxinele letale, lecitinazele, hemolizinele labile la $O_2$, ADP-ribozil-transferazele.

Lecitinazele clostridiene sunt reprezentate de α-toxina de *Clostridium perfringens* cu activitate de fosfolipază C şi care frecvent, dau reacţii serologice încrucişate.

Scanned with OKEN Scanner

Hemolizinele clostridiene $O_2$-labile sunt tetanolizina (*Clostridium tetani*), θ-toxina (*Clostridium perfringens*), δ-toxina (*Clostridium novyi, Clostridium chauvoei*) şi ε-toxina (*Clostridium histolyticum*). Lizează eritrocitele, dar şi variate alte tipuri celulare. Sunt înrudite serologic între ele, dar şi cu streptolizina O, pneumolizina, cereolizina, turingiolizina, listereolizina. Sunt inactivate în condiţii reducătoare medii, reactivate de compuşii tiolici şi inhibate de cantităţi mici de colesterol.

### *Exotoxina de Bacillus anthracis*

Prezenţa exotoxinei s-a recunoscut în 1955, în sângele cobailor morţi după infecţia cu *Bacillus anthracis*. Plasma sterilă (filtrată) de cobai produce edemul tegumentar al cobaiului normal iar injecţia intravenoasă produce moartea. Tulpinile necapsulate de *Bacillus anthracis* sunt toxigene. S-au identificat trei componente ale exotoxinei:

– *factorul* I (factorul edematos);
– *factorul* II (antigenul protector major, activator al răspunsului imun specific după infecţia cu *Bacillus anthracis*);
– *factorul* III (factorul letal).

Toxina completă, produsă *in vivo* sau *in vitro* este letală şi produce edem. Pentru efectul letal este necesară acţiunea concomitentă a celor cei 3 factori. Separat, cei 3 factori nu produc edem şi nu au efect patologic. Experimental, la iepure, factorii I şi II în amestec produc edem, iar adăugarea factorului III diminuă producerea edemului. În studiile experimentale la şobolan, acţiunea simultană a celor 3 componente produce edem pulmonar masiv şi hidrotorax. Se produce tromboza capilară şi exsudare vasculară, cu acumularea fluidului în ţesut şi formarea veziculelor endoteliale caracteristice. Se formează trombi locali, fără coagulare intravasculară. Joncţiunile între celulele endoteliale ale capilarelor pulmonare rămân intacte şi pierderea fluidului vascular se datorează permeabilităţii transcelulare. Creşterea permeabilităţii nu este mediată de eliberarea aminelor vasoactive (histamina, serotonina). Metabolismul oxidativ al ţesutului pulmonar se modifică numai în stadiul final, probabil ca efect al hipoxiei şi acidozei.

Mecanismul care produce modificările funcţionale ale endoteliului vascular (creşterea permeabilităţii şi tromboza) nu este cunoscut. Sensibilitatea diferitelor specii de organisme la toxină pare a fi, în general, corelată invers cu sensibilitatea la infecţie. Nivelul toxinei în sângele animalelor muribunde se corelează invers proporţional cu sensibilitatea la toxină. Tromboza capilară este cea mai probabilă cauză a morţii.

Toxina edematoasă este o moleculă dimeră, alcătuită din subunităţile A şi B, care se autoasamblează la suprafaţa celulei din factorul edematos şi din antigenul protector.

Scanned with OKEN Scanner

Antigenul protector are rolul de legare a toxinei de receptorii membranari neidentificaţi ai celulei sensibile. Receptorul pare ubicvitar, pentru că toate tipurile de celule testate răspund la toxina edematoasă. Antigenul este ulterior clivat de o protează şi generează un fragment mic de 20 kDa care este eliberat în mediu şi un fragment C-terminal de 63 kDa, care rămâne legat de receptor. Fragmentul de 63 kDa oligomerizează spontan şi formează un heptamer cu formă inelară, care leagă factorul edematos.

Complexul molecular alcătuit din factorul edematos-fragmentul de 63 kDa şi receptor intră în celulă prin endocitoză şi ajunge într-un compartiment acid, unde se declanşează inserţia heptamerului în membrană, iar factorul edematos este translocat în citosol. Efectul specific al factorului edematos este stimularea activităţii adenilat-ciclazei (fig. 15).

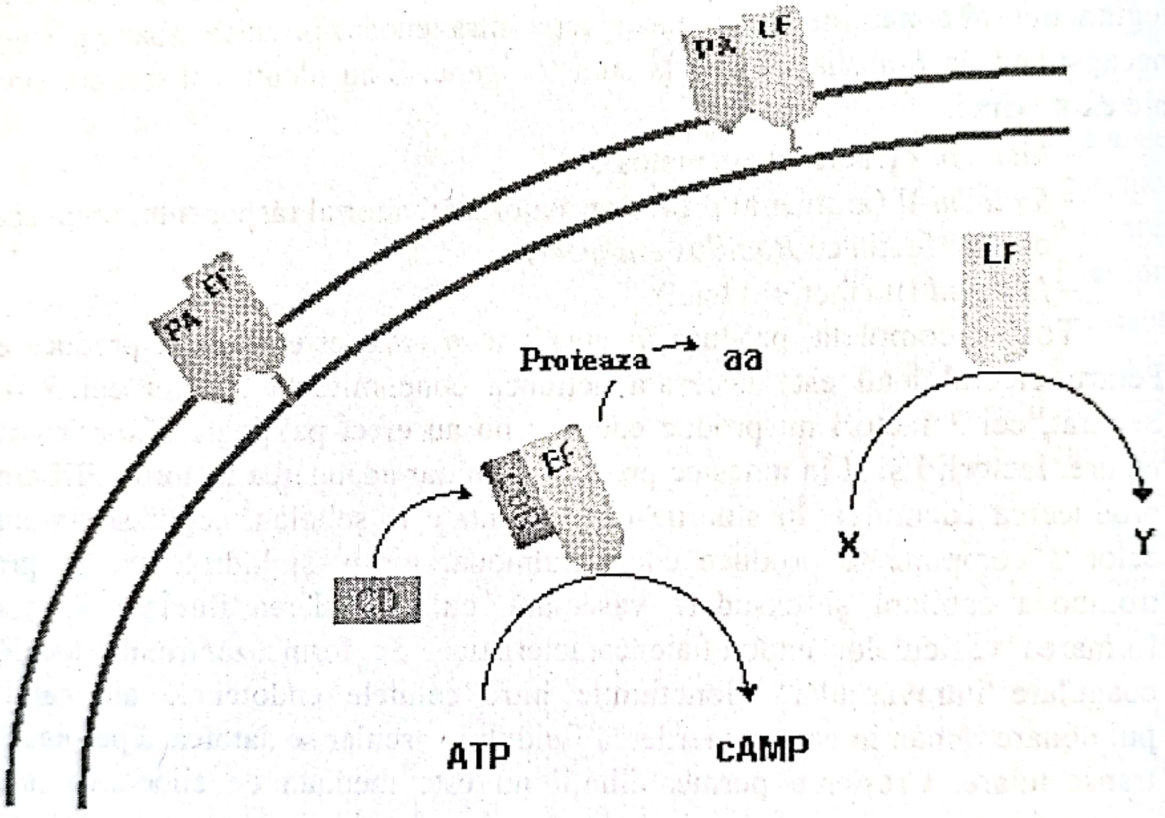



Fig. 15 – Mecanismul de acţiune al toxinei edemoatoase (PA-angtien protector; EF-factor de edem; CD-calmodulină; LF-factor letal) (după Songer, 1997).

Ca şi toxina holerică, toxina edematoasă determină creşterea nivelului AMPc în celulă, dar prin alt mecanism. În timp ce toxina holerică activează adenilat-ciclaza celulei gazdă prin ADP-ribozilarea unei subunităţi a proteinei reglatoare trimerice G, iar factorul edematos este o adenilat-ciclază dependentă de calmodulină, care catalizează formarea AMPc în citosol.

Argumentul stimulării adenilat-ciclazei a fost adus de rezultate experimentale: *in vitro*, în celulele epiteliale umane T84, toxina edematoasă a stimulat intens secreţia ionului de clor, deoarece aceste celule au un sistem de secreţie a Cl- reglat de AMPc.

Scanned with OKEN Scanner

### *Exotoxine secretate de Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* secretă cel puţin 4 enterotoxine care sunt asociate cu două tipuri de toxiinfecţii alimentare produse de *Bacillus cereus*, caracterizate prin diaree şi vomă. Enterotoxinele secretate de *Bacillus* formează pori selectivi pentru cationi cu diametrul de 7 A°.

*Citotoxina K* are acţiune hemolitică şi citotoxică pe celulele Vero şi produce enterite necrotice printr-un mecanism similar celui al α-hemolizinei stafilococice (translocaţie, oligomerizare şi formarea unui por cilindric transmembranar).

*Hemolizina BL* are acţiune hemolitică, dermonecrotică şi modifică permeabilitatea vasculară, determinând permeabilitatea dermonecrotică vasculară în pielea de iepure, citotoxicitate pe CHO şi ţesut retinal, prin inducerea de pori de dimensiuni mari ce determină liza osmotică.

### *Proteinele incluziilor cristaline de la Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* este un bacil Gram pozitiv, sporulat, comun în mediile naturale (sol, apă, suprafaţa frunzelor), care formează un cristal parasporal în faza staţionară a ciclului de creştere. Bacteria a fost considerată ca un agent patogen al insectelor şi activitatea insecticidă a fost atribuită cristalului parasporal, ceea ce a dus la dezvoltarea bioinsecticidelor bazate pe utilizarea celulelor de *Bacillus thuringiensis* pentru combaterea unor specii de insecte din ordinul *Lepidoptera*, *Diptera* şi *Coleoptera*. Ulterior s-au izolat tulpini bacteriene active faţă de *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Orthoptera*, *Mallophaga* şi faţă de nematode, căpuşe şi protozoare.

Există numeroase dovezi care argumentează că *Bacillus thuringiensis* şi *Bacillus cereus* sunt o singură specie: hibridarea ADN cromosomal, analiza fosfolipidelor şi a acizilor graşi, compararea secvenţei ARNr 16S, analiza segmentelor rezultate după acţiunea enzimelor de restricţie.

Producerea cristalului parasporal este un criteriu insuficient pentru taxonomie.

Diversitatea tulpinilor de *Bacillus thuringiensis* şi a toxinelor reflectă gradul înalt de plasticitate genetică. Cele mai multe gene cry care codifică toxina par să se găsească pe plasmide şi fac parte din structuri complexe, ca de exemplu, elementele genetice mobile. Multe plasmide care poartă gena cry sunt conjugative. Genele cry sunt un exemplu tipic de gene implicate în procesul de sporulare.

Toxinele pesticide sunt produse de *Bacillus thuringiensis* în faza staţionară de creştere.

*Bacillus thuringiensis*, ca şi *Bacillus cereus* se multiplică în hemocelul insectelor şi produc septicemie. Virulenţa este conferită de de un set de enzime extracelulare: fosfolipaze, alte toxine termo-labile, β-exotoxine, proteaze, chitinaze şi proteine insecticide secretate de celula vegetativă. Cele două specii produc compuşi cu efecte antibiotice cu activitate antifungică. Unul dintre ele acţionează

Scanned with OKEN Scanner

sinergic cu proteina din cristal şi produc intoxicaţia larvelor de lepidoptere. Toxinele cristalului sunt cei mai importanţi factori de virulenţă, deoarece permit dezvoltarea bacteriilor în larvele de insecte moarte sau cu vitalitate diminuată.

Unele tulpini de *Bacillus thuringiensis*, în timpul creşterii vegetative produc proteine insecticide în timpul fazei de creştere, care nu intră în structura cristalului parasporal.

*Proteinele Cry* au gr. mol. 130–140 kDa şi formează incluzii cristaline mari în celulă. Cantitatea mare de proteine sintetizate se explică prin stabilitatea ARNm. Timpul de înjumătăţire al ARNm cry este de circa 10 minute, adică de cel puţin 5 ori mai mare decât timpul mediu de înjumătăţire al ARNm bacterian.

Proteina-toxină cry se sintetizează sub forma unui precursor inactiv – pretoxină. În funcţie de compoziţia în pretoxină, cristalele au forme variate:

– bipiramidală (Cry 1);
– cuboidală (Cry 2);
– rectangulară aplatizată (Cry 3A);
– neregulată (Cry 3B);
– sferică (Cry 4A şi 4B);
– romboidală (Cry 11A).

Proteinele cristalului sunt solubilizate rapid în intestinul larvelor de insecte şi se activează.

Caracteristicile de structură şi de solubilitate ale cristalelor depind de diferiţi factori: de structura secundară a pretoxinei; de energia legăturilor S-S; de prezenţa altor componente specifice celulei de *Bacillus thuringiensis*.

Genele cry 1 clonate la *Escherichia coli* şi *Bacillus subtilis* codifică sinteza proteinelor active, sugerând că pretoxinele de 130-140 kDa pot să se structureze spontan în structura cristalină. Jumătatea C-terminală a pretoxinei Cry 1, bogată în cisteină, contribuie la autoasamblarea moleculei, prin formarea legăturilor S-S. Regiunea C-terminală bogată în cisteină lipseşte la pretoxinele C3A (73 kDa). Toxina formează o incluzie cristalină aplatizată rectangulară, în care polipeptidele nu par a fi legate prin punţi S-S.

S-a evidenţiat că în structura incluziei cristaline se găseşte ADN, care poate fi implicat în prelucrarea proteolitică a pretoxinei.

Molecula de toxină Cry este organizată în mai multe domenii. Domeniul I este asemănător domeniilor formatoare de pori sau de translocaţie prin membrană, ale unor toxine proteice bacteriene: colicina A, toxina difterică şi într-o măsură mai mică, exotoxinei A de *Pseudomonas*. Domeniul formator al porilor membranari al colicinei A constă din 2 α-helice centrale, înconjurate de 8 α-helice antiparalele.

Mecanismul de acţiune al proteinei Cry implică:

– solubilizarea cristalului în intestinul mediu al larvei de insectă;
– prelucrarea proteolitică a pretoxinei sub acţiunea proteazelor intestinale de tipul tripsinei şi chimotripsinei;

Scanned with OKEN Scanner

– legarea toxinei de receptorii celulelor epiteliului intestinal;
– inserţia toxinei în membrana apicală;
– formarea porilor.

Cristalele sunt alcătuite din pretoxine. Pentru activare, pretoxinele ajunse în tubul digestiv al larvelor de lepidoptere, sunt solubilizate în condiţiile alcaline ale intestinului mediu.

Diferenţele de solubilitate explică diferenţele de toxicitate al proteinelor Cry. Reducerea solubilităţii ar fi un mecanism posibil al rezistenţei insectei.

Molecula de toxină Cry activată are două funcţii:
– legarea de receptorul celulei sensibile;
– formarea porului membranar.

Toxina activată se leagă de receptorii specifici ai bordurii apicale în perie ai microvililor intestinului mediu al insectei sensibile. Legarea este un proces în două trepte: legarea reversibilă şi ireversibilă. Legarea ireversibilă semnifică legarea strânsă a toxinei de receptorul celular şi inserţia toxinei în membrana apicală.

Receptorul celular al proteinelor Cry poate fi aminopeptidaza N, o proteină membranară de tipul caderinei sau fosfataza alcalină.

S-au studiat efectele toxinelor Cry asupra culturilor celulare de insecte (CF 1). Toxinele Cry au activitate citolitică prin mecanismul lizei osmotice coloidale. Porii membranari formaţi sub acţiunea toxinei favorizează influxul apei şi pierderea echilibrului ionic al celulei.

Celulele *in vitro* nu reprezintă modelul optim de studiu, deoarece sunt menţinute la pH 6,8 şi nu la pH alcalin din lumenul intestinal al insectelor. Ele nu au receptorii specifici ai intestinului mediu şi răspunsul lor la acţiunea toxinei nu are specificitatea celulelor intestinale *in vivo*. Celulele *in vitro* sunt tolerante la nivele de 1000 de ori mai mari de toxină, decât insectele în condiţii patologice.

Proteinele Cry nu sunt patogene pentru mamifere, păsări, reptile sau amfibieni, dar au acţiune specifică faţă de grupele de insecte şi nevertebrate.

### *Exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas* este o bacterie ubicvitară în sol, pe suprafaţa materiei vegetale, în apele dulci şi marine. Numeroase tulpini se pot dezvolta la temperatură scăzută (psichrofile) şi contaminează produsele alimentare sau farmaceutice conservate la rece. Uneori se poate izola din microbiota intestinală a omului şi animalelor. Are capacitatea de a rezista la numeroase antibiotice şi antiseptice, ceea ce explică frecvenţa tot mai mare a infecţiilor nosocomiale (infecţii din mediul spitalicesc) cu *Pseudomonas*.

*Pseudomonas aeruginosa* este un patogen oportunist, care determină infecţii, uneori fatale, la persoanele cu deficienţe ale sistemelor de apărare. Produce infecţii pulmonare la cei cu fibroză chistică, infecţii ale arsurilor şi ale tractului urinar. Bacteria produce substanţe difuzibile, majoritatea având efecte toxice pentru

Scanned with OKEN Scanner

celulele în cultură, pentru animale şi pentru om. Factorii toxici sunt reprezentaţi de endotoxină şi de exotoxine. LPS de *Pseudomonas aeruginosa* este mai puţin toxic decât LPS de la alte bacterii Gram negative.

*Exotoxina A (ETA)*, o proteină termolabilă de 613 aminoacizi, este compusul proteic cel mai toxic, produs în cantitate foarte variabilă în funcţie de tulpină şi reprezintă principalul factor de virulenţă, cu acţiune letală pentru şoarece şi câine. Efectele cele mai ample se produc la nivelul ficatului, unde are loc o reducere a ratei sintezei proteice cu circa 50%. Exotoxina A fost purificată şi s-a demonstrat că din punct de vedere biochimic este un amestec format din două fosfolipaze C. Ambele hidrolizează fosfatidil-colina, dar una dintre ele este şi sfingomielinază. Doza letală a preparatului purificat este mai mică de 1 µg/kg.

Analiza cromatografică a evidenţiat că molecula ETA este organizată în trei domenii:

– domeniul N-terminal, care se leagă de receptorul celular, neidentificat;
– un domeniu intern de translocaţie;
– domeniul C-terminal, catalitic.

ETA este internalizată prin mecanismul endocitozei mediate de receptori. În endosom este prelucrată proteolitic şi generează fragmentul catalitic C-terminal.

Exotoxina A prezintă asemănări structurale şi funcţionale cu toxina difterică, dar nu poate fi transformată în anatoxină.

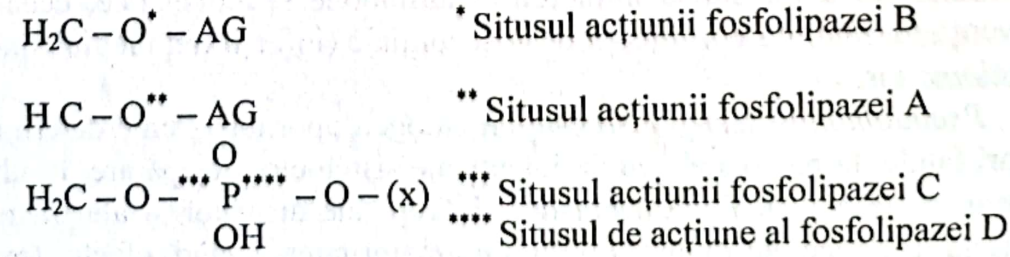
*Exotoxina* S este produsă de tulpinile care produc infecţii pulmonare şi are un potenţial toxic inferior celui al exotoxinei A.

*Proteazele* (elastaza, colagenaza) au efecte toxice minime, dar produc leziuni tisulare.

*Hemolizina* este o fosfolipază C.

*Piocianina* este o proteinază fără activitate enzimatică care se leagă de flavoproteinele din lanţul citocromic interferând cu transportul final de electroni, genrând astfel un deficit de energetic care antrenează moartea celulară.

Proteaza, elastaza, hemolizina, exotoxina A alterează ţesuturile gazdei, distrug proteinele complementului, imunoglobulinele şi fibronectina (proteina care protejează celulele epiteliale de bacteriile în curs de aderare). În plămân, fosfolipaza C* atacă pelicula de surfactant (care acoperă endoteliul alveolar şi inhibă transudarea fluidelor capilare). Acţiunea conjugată a toxinelor şi enzimelor duc la necroza tisulară şi uşurează invazia bacteriană.




* Situsul acţiunii fosfolipazei B

** Situsul acţiunii fosfolipazei A

*** Situsul acţiunii fosfolipazei C

**** Situsul de acţiune al fosfolipazei D

Scanned with OKEN Scanner

### *Toxinele stafilococice*

*Staphylococcus aureus* produce o varietate de exoproteine care condiţionează capacitatea sa de a coloniza ţesuturile şi de a cauza diferite boli la mamifere. Aproape toate tulpinile secretă un grup de enzime şi citotoxine: 4 hemolizine (α, β, γ, δ), nucleaze, proteaze, lipaze, hialuronidaza şi colagenaza. Produsele difuzibile ale stafilococilor produc efecte lezionale asupra ţesuturilor mamaliene, dar în special asupra hematiilor şi leucocitelor. Funcţia acestor proteine, cu rol de factori de virulenţă, este de a converti ţesuturile gazdei în nutrienţi utilizabili pentru creşterea celulei bacteriene.

Unele tulpini de *Staphylococcus aureus* produc una sau mai multe exoproteine suplimentare care includ: toxina 1 a sindromului de şoc toxic (TSST-1), enterotoxine (SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH, SEI), toxine exfoliative (ETA şi ETB) şi leucocidina.

### *Superantigenele toxice pirogene*

TSST-1 şi enterotoxinele sunt cunoscute ca superantigenele toxice pirogene (SAgTP). Grupul SAgTP formează o familie de exotoxine secretate de *Staphylococcus aureus* (TSST-1, majoritatea enterotoxinelor) şi de *Streptococcus pyogenes* (exotoxinele streptococice piogene SPEA, B, C, F, G, H şi J şi superantigenele streptococice), grupate împreună deoarece au caracteristici funcţionale comune.

Fiecare dintre aceste exotoxine are cel puţin 3 proprietăţi biologice: pirogenitate, superantigenitate şi capacitatea de a ridica letalitatea endotoxinei, de circa 100 000 de ori, în teritoriile experimentale pe iepure.

Funcţia lor primară este de a represa funcţia imunitară, dar unele produc şi alte efecte biologice:

- enterotoxinele stafilococice sunt agenţi emetici;
- TSST-1 traversează mucoasele şi reactivează artrita indusă ca răspuns la antigenele din peretele celular bacterian ;
- exotoxinele streptococice pirogene induc necroza miocardică;
- exotoxina streptococică pirogenă A se leagă strâns cu endotoxina şi are efecte toxice pentru celulele sistemului imunitar.

Proprietatea definitorie a acestei familii de toxine pirogene este superantigenitatea, care defineşte capacitatea acestor exotoxine de a stimula proliferarea limfocitelor T, indiferent de specificitatea lor antigenică.

Exotoxinele secretate de *Staphylococcus aureus* se sintetizează în faza postexponenţială de creştere. Genele codificatoare sunt plasmidiale, fagice sau elemente genetice heterologe denumite insule de patogenitate.

Exotoxinele sunt traduse într-o proteină precursoare, care conţine o secvenţă terminal de aminoacizi, care este clivată în timpul exportului din celulă.

Scanned with OKEN Scanner

Superantigenele toxice pirogene sunt molecule polipeptidice mici, neglicozilate, cu GM 20–30 kDa. Au stabilitate moderată la inactivarea chimică, la proteoliză şi la denaturare prin fierbere. Secvenţa de aminoacizi a diferitelor toxine din această familie relevă o identitate a secvenţei cuprinsă între 22–80%.

TSST-1 este un polipeptid de 22 kDA, cu punctul izoelectric la pH 7,2. Are o proporţie mare a aminoacizilor hidrofobi, dar e foarte solubilă în apă. Nu are resturi de cisteină şi este rezistentă la căldură şi proteoliză: activitatea biologică se păstrează după fierbere timp de o oră şi molecula nu este clivată după expunerea prelungită la tripsină.

*Enterotoxinele stafilococice* (SEA ---- SEI), cu excepţia SEF sunt produse de stafilococii coagulazo-pozitivi. Toate produc emeza şi gastroenterita la primate, sunt superantigene, au rezistenţă intermediară la căldură şi la digestia cu pepsină, au asemănare structurală, inclusiv punţi S-S. S-au identificat 8 variante antigenice de enterotoxine: SEA, B, C, D, E, G, H, I. SEC are 3 subtipuri antigenice: SEC1 – SEC3. Greutatea moleculară e cuprinsă între 28–35 kDa.

Toate enterotoxinele păstrează o proporţie de 15% a aminoacizilor, identică în secvenţa primară a tuturor variantelor antigenice, localizată fie central, fie la capătul C-terminal.

Enterotoxinele stafilococice produc intoxicaţia alimentară. Voma şi diareea apar la 2–6 ore după ingestia alimentelor care conţin enterotoxina preformată. 1 μg de toxină produce simptomele caracteristice la om.

Spre deosebire de enterotoxinele bacteriilor Gram negative, cea de *Staphylococcus* produce efectele chiar după injectare intravenoasă. Acţionează asupra viscerelor abdominale şi stimulii ajung la centrul vomei pe cale vagală şi pe calea terminaţiilor simpatice. În gastrita acută, acţiunea toxică se produce direct asupra celulelor din mucoasa jejunală.

*Hemolizinele*

Pe baza testelor hemolitice şi serologice s-a stabilit existenţa a 4 hemolizine (α, β, γ, δ), diferite de o leucocidină activă asupra leucocitelor umane.

*Hemolizina α* este cea mai studiată dintre toate citotoxinele de *Staphylococcus aureus*. Este produsă de majoritatea tulpinilor de *Staphylococcus aureus*. Este citolitică, hemolitică, dermonecrotică şi letală. Este o proteină formată dintr-un singur lanţ polipeptidic de 293 aminoacizi, cu GM 26–36 kDa, cu un coeficient de sedimentare de 3 S. Nu are resturi de cisteină şi este alcătuită în primul rând din secvenţe pliate (65%), iar structura α-helicală reprezintă numai 10% din structura secundară. Molecula este alcătuită din 2 domenii C-terminal şi N-terminal unite printr-o buclă sensibilă la proteaze, cu conţinut ridicat în glicină, care reprezintă singura porţiune hidrofobă a acestei molecule cu structură primară extrem de hidrofilă, ceea ce explică hidrosolubilitatea sa.

O formă polimerizată, formată probabil din 6 monomeri, de 12 S, se găseşte în preparatele de toxină purificată. La microscopul electronic, pe preparatele

Scanned with OKEN Scanner

colorate negativ, polimerul are aspect inelar. Formarea sa este indusă, probabil, de digliceride. Circa 80–95% dintre molecule au p i la pH 8,5.

Hemolizina α este toxică pentru un spectru larg de celule ale mamiferelor. Este foarte activă faţă de eritrocitele de iepure, este dermonecrotică şi neurotoxică. Toxina purificată conţine circa 103 DL50/mg pentru şoarece şi 2 × 104 unităţi hemolitice/mg, pentru eritrocitele de iepure. Caracteristica definitorie a toxinei α este capacitatea de a liza eritrocitele. Cele mai sensibile la liză sunt eritrocitele de iepure, iar cele mai rezistente, cele umane.

Toxina este secretată sub formă inactivă, hidrosolubilă. Monomerii de hemolizină α sunt secretaţi de *Staphylococcus aureus* şi sunt integraţi în membrana celulei ţintă. Dacă toxina α este în concentraţie mică, se leagă de un receptor neidentificat. La concentraţie mare, hemolizina α aderă nespecific de membrana citoplasmatică. Monomerul nu poate penetra stratul lipidic. Pentru a acţiona asupra celulei ţintă, este necesară asamblarea a cel puţin 7 molecule de toxină pentru a forma un domeniu hidrofob destul de mare care să permită o interacţiune stabilă cu bistratul lipidic membranar. Heptamerul format descrie un canal cu resturile hidrofile la interior şi cele hidrofobe la exterior. Buclele centrale se pliază formând un cilindru care poate penetra bistratul lipidic şi forma un por stabil de 1–2 nm. Distrugerea celulelor endoteliale poate afecta permeabilitatea vasculară, ceea ce duce la extravazarea plasmei şi albuminei în ţesuturi.

O dată cu formarea porilor şi cu influxul ionilor de Ca, se activează metabolismul acidului arahidonic. Sinteza tromboxanului şi prostaciclinei din acidul arahidonic ca precursor, induce efectul vasoconstrictor. Creşterea volumului celulelor endoteliale produce degradarea celulelor şi creşterea permeabilităţii vasculare, având drept consecinţă *in vivo* apariţia edemului pulmonar.

Alt mecanism al edemului produs de toxina α este contracţia celulelor endoteliale, cauzată de influxul ionilor de Ca. Astfel se creează mici spaţii intercelulare.

Influxul ionului de Ca poate stimula nucleazele celulare, care produc moartea apoptotică a celulelor. Sub acţiunea toxinei α, macrofagele secretă de asemenea cantităţi mai mari de IL-1β cu funcţie proapoptotică.

Neurotoxicitatea toxinei α s-a observat la iepure şi la şoarece şi se manifestă prin distrugerea tecii de mielină ale nervilor la iepure şi ale cortexului cerebral la şoarece.

Aceste efecte diversificate se datorează în primul rând alterării echilibrului ionic al celulelor sensibile.

Hemolizina β este o toxină activă atât la rece, cât şi la cald faţă de eritrocitele de berbec, bovine, caprine, umane. Cele de iepure şi cobai sunt relativ rezistente. Titrul mare de toxină β este produs de tulpinile de *Staphylococcus aureus* de origine animală. Toxina β este mai activă decât toxina α, doza minimă pentru eritrocitele de berbec fiind de 106 unităţi hemolitice/mg. Toxina β necesită pentru activare prezenţa ionilor de $Mg^{2+}$. Toxina β este o fosfolipază C cu specificitate

Scanned with OKEN Scanner

pentru sfingomielină şi fosfatidilcolină. Produsele de hidroliză care rezultă sunt ceramida (N-acil-sfingozina) şi fosforil-colina. Toxina nu este toxică pentru fibroblastele pulmonare umane diploide (evaluată prin eliberarea H3-uridinei).

Sensibilitatea diferită a eritrocitelor la hemolizina β se poate datora conţinutului diferit în sfingomielină al eritrocitelor.

Activitatea hemolitică creşte prin incubare succesivă la 37° şi apoi la o temperatură mai mică de 10°. De aici derivă denumirea de hemolizină cald-rece. Mecanismul care explică hemoliza cald-rece: la cald, forţele coezive ale hemolizinei α cu componentele membranei menţin împreună produsele de hemoliză, dar la rece fazele se separă şi determină colapsul dublului strat.

Hemolizina β este secretată în mediul extern ca o exotoxină cu gr. mol. 35 kDa. Primele 34 de resturi formează secvenţa semnal, clivată în timpul secreţiei. Este bazică, cu punct izoelectric la pH mai mare de 9.

Hemolizina γ şi leucocidina sunt alcătuite din 2 componente ce acţionează sinergic, ambele fiind necesare pentru hemoliză şi toxicitate. Sunt secretate în formă neasociată şi au fost denumite proteine F şi S (fast – rapidă şi respectiv slow – lentă), în funcţie de dinamica separării în coloana schimbătoare de ioni. Componenta I (29 kDa) şi componenta II (26 kDa) au fost separate prin cromatografie pe hidroxiapatită. Sunt proteine cu sarcină cationică, cu punct izoelectric la 9,8 şi respectiv 9,9. Toxina α are specificitate pentru eritrocitele umane, de iepure şi de berbec. Induce sinteza anticorpilor neutralizanţi.

Hemolizina γ este sintetizată aproape de toate tulpinile de *Staphylococcus aureus*, iar leucocidina este produsă de 2–3% dintre tulpini. Ambele influenţează funcţiile neutrofilelor şi macrofagelor, iar hemolizina γ lizează eritrocitele unui număr mare de specii de mamifere.

Producerea hemolizinei γ nu se detectează pe plăcile cu agar-sânge, datorită efectului inhibitor al agarului asupra activităţii toxinei.

Leucocidina este activă numai faţă de polimorfonuclearele şi macrofagele umane şi de iepure. Este alcătuită din 2 proteine: F (*fast*) şi S (*slow*), în funcţie de migrarea lor pe coloana de CMC, cu gr. mol. 32 respectiv 38 kDa. Separate, cele două proteine sunt inactive, dar acţionează sinergic asupra leucocitelor şi le lizează prin creşterea permeabilităţii faţă de cationi.

Hemolizina δ este un polipeptid de 26 de aminoacizi, relativ termostabilă. Preparatele purificate au activitate scăzută şi produc hemoliza nespecifică a eritrocitelor câtorva specii de mamifere. Toxina δ acţionează ca surfactant şi rupe membrana celulei. Este un polipeptid din care lipsesc His, Arg, Pro, Tir şi Cis. *In vivo* produce umflarea mitocondriilor, inhibă respiraţia mitocondrială şi fosforilarea oxidativă. *In vitro* nu produce efecte toxice detectabile.

### *Exfoliatina*

Pacienţii cu necroliză epidemică toxică, denumită dermatită exfoliativă generalizată, manifestă un eritem intens, foarte evident în tegumentul din jurul

Scanned with OKEN Scanner

cavității bucale și nasului, care progresează rapid spre gât, trunchi și uneori la membre. Eritemul este, în mod obișnuit urmat, în câteva ore, de pierderea epidermei prin desprinderea unor fragmente mari. Maladia apare la copii, dar s-a semnalat și la adulți. Impetigo bulos (leziuni localizate diseminate) și eritemul (rash) scarlatinos fără exfoliere sunt considerate variante clinice ale maladiei.

Deși sunt denudate arii tegumentare extinse, recuperarea este rapidă și vindecarea leziunilor este totală, fără cicatrice.

*Exfoliatina* este produsă de 40% dintre tulpinile de *Staphylococcus aureus*, ce aparțin grupului fagic 2. Sinteza exfoliatinei este stimulată de adăugarea extractului de levuri la mediul de creștere și de incubarea în atmosferă cu $CO_2$. Glucoza inhibă sinteza toxinei.

Exfoliatina este o glicoproteină de 24 kDa, termostabilă. Este antigenică și induce sinteza anticorpilor neutralizanți.

Exfoliatina produce exfolierea tegumentului numai la om și șoarece. Chiar injectarea intraperitoneală produce exfolierea, ceea ce arată că exfoliatina are țintă specifică în tegument. Omul este de 3–4 ori mai sensibil decât șoarecele nou-născut. La om, injectarea a 0,2–5 μg de exfoliatină purificată, produce pierderea demonstrabilă a pielii în 30–60 de minute, iar între 8 și 24 de ore, efectele sunt maxime. Leziunile eritematoase sunt sensibile la atingere, dar nu sunt dureroase.

Stafilococii producători de exfoliatină s-au izolat din tractul respirator superior, conjunctivă sau de pe suprafața tegumentului intact. Lichidul aspirat din veziculele intacte este cel mai adesea steril, dar leziunile denudate sunt rapid colonizate cu tulpinile tegumentare.

Tulpinile de *Staphylococcus aureus* produc cel puțin două toxine distincte serologic: A (242 aminoacizi) și B (246 aminoacizi). Au omologie de 40% a aminoacizilor și ambele pot produce boala la om. Se sintetizează în faza postexponențială a culturii. *In vivo*, toxinele sunt absorbite în circulația sistemică și ajung în stratul granular al epidermei. Exfoliatina B are afinitate foarte mare pentru extractul de celule epidermice, dar nu se știe dacă toxinele acționează intracelular. Probabil că exfoliatinele pătrund în celulele stratului granulos, se asociază cu keratohialina pe care o hidrolizează și duc la ruperea structurilor de coeziune intercelulară, pentru că granulele de keratohialină sunt legate de filamentele de keratină, care se extind la dezmosomi.

### *Toxine streptococice*

*Streptococcus pyogenes* produce infecții supurative la om, dintre care faringita acută și impetigo sunt cele mai comune. Datorită ineficienței terapiei cu antibiotice sau în absența terapiei, 3–5% dintre indivizii cu infecție faringiană streptococică pot dezvolta sechele cronice nesupurative consecutive infecției streptococice, printre care se numără și febra reumatică acută, maladie care este cauza principală a bolii cardiace la copiii de vârstă școlară.

Scanned with OKEN Scanner

*Streptococcus pyogenes* sintetizează şi secretă un număr mare de produşi, al căror rol în patogeneză nu este complet elucidat.

Toxinele pirogene streptococice sau toxinele eritrogene sunt responsabile de pirogenitate, amplificarea simptomelor şocului endotoxic şi de efectul de superantigene asupra sistemului imunitar al gazdei. Superantigenele sunt molecule cu efect activator policlonal al diferitelor subpopulaţii de limfocite care nu necesită însă procesare de către celulele prezentatoare de antigen. Superantigenele leagă lanţul beta (V) al unor receptori caracteristici de pe suprafaţa limfocitelor T, precum şi moleculele CMH clasa II de pe suprafaţa limfocitelor B, monocitelor şi celulelor dendritice. Activarea policlonală a limfocitelor T duce la proliferarea acestora şi la secreţia de citokine (IL-1, IL-6, IFN-α, TNF-β), responsabile de simptomele specifice din scarlatină şi sindromul de şoc toxic (febră, hipotensiune etc.). Toxinele eritrogene streptococice au fost grupate în 4 grupe: A, B, C, D şi prezintă omologii de secvenţă cu toxinele pirogenice stafilococice A şi C. Genele (spe) speA şi speC sunt localizate pe un bacteriofag, în timp ce spe B este cromosomală. Toxina eritrogenă A este toxina scarlatinoasă clasică, folosită iniţial de Dick, pentru a testa sensibilitatea la agentul infecţios al febrei scarlatinoase. Infecţia cu agentul febrei scarlatinoase nu protejează faţă de infecţiile streptococice viitoare. Toxina eritrogenă este o proteină de 30,5 kDa şi poate lega molecule foarte mici sau alte proteine prin intermediul grupării –SH. Gena pentru exotoxina A eritrogenă prezintă 4 alele notate A1-A4, dintre care A3 este cea mai activă mitogenic şi are afinitate înaltă pentru molecula DQ HLA. Date recente au arătat că indivizii cu haplotipul II sunt mai predispuşi la sindrom de şoc toxic streptococic sever.

*Toxina B* este o cistein-protează care degradează vitronectina, fibronectina şi precursorul Il-1. Cistein proteaza este secretată sub formă de zimogen de 40 kDa, care în condiţii reducătoare este clivată la o enzimă proteolitic activă de 28 kDa. În cazul maladiilor produse de streptococi de grup A, precum faringita, febra reumatismală şi maladii invazive, pacienţii sintetizează anticorpi anti-proteinază. În cazul maladiilor invazive fatale, pacienţii au niveluri inferioare de anticorpi anti-exotoxina B faţă de cei cu infecţii minore cu streptococi de grup A. Neutralizarea activităţii exotoxinei B poate proteja împotriva manifestărilor severe ale maladiilor. Imunizarea şoarecilor cu protează sau cu exotoxină B pirogenă streptococică măreşte rata de supravieţuire a şoarecilor infectaţi cu tulpini heterologe ale streptococilor de grup A. Protecţia pasivă sau amplificarea timpului de supravieţuire s-au putut obţine după administrarea la şoareci, a anticorpilor anti-protează. De aceea, proteazele streptococice induc sinteza, a anticorpilor cu efect protector la animale. Aceste studii au condus la cercetarea exotoxinei B pirogene ca potenţial vaccin, care ar amplifica imunitatea împotriva maladiilor invazive severe, precum şi împotriva altor maladii streptococice.

*Cisteinproteaza* converteşte precursorul IL-1β la forma IL-1β activă, o citokină inflamatorie. Cercetările demonstrează de asemenea, că proteaza degradează vitronectina, fibronectina şi activează metaloproteaza de 66 kDa din matricea

Scanned with OKEN Scanner

celulară endotelială la om. În plus, s-a mai demonstrat că proteaza clivează şi eliberează molecula de plasminogen, receptor activator al urokinazei de pe suprafaţa leucocitelor mononucleare, care eliberează chinine active biologic din precursorii ei. Activarea enzimelor, care degradează matricea extracelulară a ţesuturilor, poate duce la deteriorarea ţesuturilor în cazul infecţiilor invazive streptococice. Proteaza produce deteriorări în culturile de celule endoteliale ale venei ombilicale umane, ca şi în cazul maladiilor streptococice invazive. Faptul că protează streptococice activează o metaloprotează a matricei extracelulare demonstrează implicaţiile proteazei streptococice în patogeneza maladiilor invazive.

Analiza secvenţei genei pentru exotoxina B pirogenă de la 200 de izolate streptococice de grup A a evidenţiat faptul că există 3 variante. În urma cercetării celor 3 variante s-a identificat mSpeB2, cu un motiv RGD (arginina-glicina-acid aspartic), care leagă preferenţial integrinele umane $\alpha_v\beta_3$ si $\alpha_{IIb}\beta_3$. Varianta mSpeB2 a proteazei este exprimată de toate tulpinile M1 virulente şi de numeroase alte clone, care cauzează maladii invazive în toată lumea. Această variaţie alelică unică poate influenţa interacţiile gazdă-patogen în cazul maladiilor invazive.

S-a demonstrat că inactivarea exotoxinei B scade semnificativ rata de mortalitate la şoareci generată de serotipurile M3 si 49, iar inactivarea exotoxinei B nu are nici un efect asupra virulenţei infecţiilor invazive ale ţesuturilor pe modelul murin. Exotoxina B, *in vitro*, măreşte gradul de internalizare a streptococilor de grup A de către celulele epiteliale şi endoteliale umane. Inactivarea genetică a cisteinproteazei a dus la eliminarea rapidă a exotoxinei B mutante din cavitatea peritoneală şi la reducerea diseminării în organe. Dovezile sugerează că proteaza streptococică promovează rezistenţa la fagocitoză şi diseminarea bacteriană. Cercetările sugerează deasemenea că expresia cisteinproteazei contribuie la supravieţuirea extracelulară a streptococilor de grup A în gazdă. Mecanismul exact prin care proteaza funcţionează în prevenirea fagocitozei şi mărirea virulenţei este necunoscut. Oricum, activitatea proteolitică asupra proteinei M, peptidaza C5a sau moleculele gazdei pot avea efect asupra virulenţei şi patogenezei.

*Alte exotoxine pirogenice streptococice* sunt reprezentate de factorul mitogenic SpeF, superantigenul streptococic A (SSA), exotoxina streptococică mitogenică Z1 şi Z2 (SMEZ) şi trei superantigene recent identificate codificate de genele speG, speH, şi speJ prezente la *Streptococcus pyogenes*. SpeH prezintă omologie de secvenţă cu enterotoxinele stafilococice. Manifestările clinice ale sindromului streptococic de şoc toxic s-ar datora în parte producţiei masive de citokine induse de superantigen. S-a demonstrat că SpeA, SpeB si SpeF induc sinteza masivă a interferonului γ şi TNFβ, cu răspuns slab de tip Th2. În general, superantigenele induc sinteza citokinelor IL1, IL6, interferon γ şi TNFβ. Profilurile citokinelor şi răspunsurile proliferative la SpeF diferă între indivizi. Variaţia inviduală a răspunsului la superantigeni poate duce la variatii în severitatea clinică. Weeks şi Ferretti au descoperit secvenţa de nucleotide a genei exotoxinei A

Scanned with OKEN Scanner

streptococice pirogene şi s-a mai demonstrat că gena este exprimată cel mai mult la tulpinile streptococice izolate din cazurile de sindrom streptococic de şoc toxic. În acest studiu, 85% dintre pacienţii cu sindrom streptococic toxic, aveau tulpini care produceau exotoxina A pirogenă. În studiile lui Yu şi Ferretti, 45% din izolatele din cazurile de scarlatină şi 15% din izolatele neasociate maladiilor conţineau gena pentru exotoxina pirogenică A. Xu şi Collins au descoperit că gena este exprimată mult mai puternic dacă tulpinile sunt crescute la 37°C şi apoi la 26°C. Secvenţierea genei speA la tulpini asociate diferitelor focare a evidenţiat prezenţa a 4 alele naturale de speA. Alelele speA1, speA2 şi speA3 codifică pentru toxine care diferă printr-un singur aminoacid, iar speA4 codifică pentru o toxină cu o divergenţă de 9% faţă de celelalte 3 toxine şi prin 26 de aminoacizi substituiţi. Alelele speA2 şi speA3 sunt exprimate la majoritatea izolatelor recente din sindrom streptococic toxic. Kline şi Collins au sintetizat 20 de toxine mutante speA, iar rezultatele lor sugerează că speA3 este mult mai mitogenă şi are afinitate mai înaltă pentru HLA DQ decât SpeA1. Cercetări recente ale lui Kotb sugerează că haplotipul individual de clasa II reprezintă un factor de risc clinic pentru sindromul streptococic toxic sever. Astfel rezultatele sugerează că ar exista o predispoziţie genetică pentru maladii invazive şi sindrom streptococic toxic indus de superantigen.

Superantigenele streptococice pot avea un rol în răspunsurile autoimune din cazul sechelelor streptococice. Proteina PepM acţionează ca un superantigen şi stimulează expansiunea subseturilor de limfocite T Vβ 2, 4 şi 8. Studiile altor laboratoare emit ipoteza că proteina M nu este un superantigen. Oricum, s-a demonstrat că există un situs superantigenic în proteina streptococică M5 (resturile de aminoacizi de la 157 la 197, KEQEMKETIGTLKKILDETVKDKLAKEQKSK QMIGALKQEL). Situsul superantigenic este regiunea repetitivă B3 din regiunea repetitivă B a proteinei M5 şi are omologie semnificativă de secvenţă cu alte superantigene. Situsul conţine secvenţa QKSKQ despre care s-a demonstrat anterior că reacţionează cu anticorpii anti-miozina în cazul febrei reumatismale acute.

Răspunsurile inflamatorii declanşate de exotoxinele streptococice pirogene sau superantigene pot duce la manifestări şi răspunsuri autoimune. Modificarea *pattern*-ului citokinic către sinteza de citokine inflamatorii poate fi parţial responsabilă pentru manifestările autoimune din cazul sechelelor streptococice.

Analiza de secvenţă a identificat trei variante ale exotoxinei B (notate speB1-B3), dintre care SpeB2, prezintă un domeniu (RGD) (arginină-glicină-acid aspartic) care se leagă preferenţial la integrinele umane v3 şi IIb3. SpeB2 este produsă de tulpinile înalt virulente şi cu potenţial invaziv crescut ale serogrupului M1, asigurând protecţia faţă de fagocitoză, creşterea internalizării streptococilor de către celulele epiteliale prin mecanisme insuficient elucidate, dar demonstrate în studii de patologie experimentală.

*Streptolizinele (SLO şi SLS)* produc efectul hemolitic şi citotoxic al filtratului de cultură. Ele lizează celulele sensibile prin acţiunea asupra membranei

Scanned with OKEN Scanner

citoplasmatice. Streptococii de grup antigenic A produc una sau mai multe tipuri de toxină eritrogenă, denumită toxina scarlatinoasă sau exotoxina pirogenică streptococică, care deşi nu are potenţial letal ridicat asupra animalelor de laborator, produce o serie de efecte biologice.

*Streptolizina O (SLO)*

Este produsă de toţi streptococii de grup A şi de unele tulpini de grup C şi G. Este prototipul unui grup de toxine labile în prezenţa $O_2$, produse de diferite bacterii Gram pozitive. Toate sunt activate de compuşii cu gruparea –SH. Sunt înrudite antigenic. Activitatea lor este complet inhibată de concentraţiile mici de colesterol şi de alţi steroli înrudiţi.

Principala caracteristică a SLO este activitatea hemolitică. Adăugarea unor concentraţii foarte mici de SLO, la suspensia de eritrocite, la 37°, produce hemoliza într-un interval de ordinul minutelor, ceea ce sugerează că efectul primar al toxinei constă în alterarea structurii membranei celulare. SLO lizează sau produce leziuni la nivelul altor tipuri celulare şi organitelor delimitate de membrană.

Interacţiunea iniţială a SLO cu celula constă se pare în legarea reversibilă a moleculei de toxină cu membrana celulară. Numai toxina în stare redusă este adsorbită. Adsorbţia este independentă de temperatură, pH, concentraţie ionică.

Receptorul membranar care leagă SLO este colesterolul. Sunt sensibile la toxină numai membranele care conţin colesterol. Adăugarea colesterolului la preparatul de SLO inhibă complet activitatea hemolitică. SLO nu se adsoarbe pe membrana eritrocitelor tratate cu agenţi care se leagă la colesterolul membranar (antibotice polienice, saponine).

Liza eritrocitelor este dependentă de temperatură (cu excepţia concentraţiei mari de SLO) şi este inhibată de concentraţia ionică mare, de pH-ul mic sau de cationii bivalenţi. Liza unei hematii de iepure este produsă de 2–3 molecule de SLO şi este consecutivă formării unor discontinuităţi cilindrice („găuri") în membrana eritrocitului, cu diametrul de 50 nm.

SLO pare a fi implicată în procesul patologic al febrei reumatice*. SLO eliberată în ţesuturi şi în circulaţie, în timpul infecţiei, se combină cu anticorpii specifici anti-SLO (ASLO) şi continuă să circule sub forma complexelor Ag-Ac. Procesul infecţios poate fi eradicat din organism, dar complexele imune SLO-ASLO se disociază lent, eliberează SLO activă, care se acumulează pe/în ţesuturile sensibile (inimă, articulaţii), până este atins nivelul toxic. În acest moment apar simptomele care caracterizează faza acută a febrei reumatice.

* Febra reumatică este o complicaţie relativ rară a faringitei streptococice, care apare la 2–4 săptămâni după infecţia bacteriană. Este o afecţiune provocată de complexele imune circulante, care se localizează în regiunile articulare. Se manifestă ca o poliartrită febrilă, cu evoluţie favorabilă, singurul risc fiind complicaţiile valvulare cardiace, miocardice sau pericardice. Febra reumatismală este consecutivă infecţiei tractului respirator cu *Streptococcus pyogenes*. După 2–3 săptămâni se

Scanned with OKEN Scanner

dezvoltă o maladie asemănătoare maladiei serului, cu febră, artrită, uneori choree şi cardită. Anticorpii cu reactivitate încrucişată atacă valvele cardiace, pentru că antigenele *self* ale ţesutului cardiac se aseamănă cu proteina M din *Streptococcus haemolyticus*. Riscul complicaţiilor cardiace este mai mare pentru indivizii cu grup sanguin A. Toate grupele sanguine au un precursor antigenic comun – antigenul H (codificat de gena H) – pe suprafaţa eritrocitelor, bine exprimat cantitativ la persoanele de grup 0. Specificitatea antigenică a hematiilor de grup 0 este conferită de L-fucoză. Grupul A are o altă genă ce codifică sinteza glicozil-transferazei, enzimă ce adaugă N-acetil-D-galactozamina, la galactoza preterminală a substanţei H. De aceea, specificitatea antigenică a eritrocitelor grupului A este dată de N-acetil-D-galactozamină şi de L-fucoză.

Indivizii grupului B au o genă ce adaugă D-galactoza la galactoza preterminală a moleculei H şi specificitatea antigenică a eritrocitelor este dată de D-galactoză şi L-fucoză.

Glucidul terminal al polizaharidului streptococic este N-acetil-D glucozamina, legată de un polimer de ramnoză. Diferenţa dintre N-acetil-D glucozamină şi N-acetil-D galactozamină este grupul OH. De aceea, antigenele de grup sanguin A se aseamănă cu antigenul streptococic mai mult decât cele ale grupului 0. La fel pentru antigenele de grup B, la care D-galactoza este mai asemănătoare structural cu N-acetil-D glucozamina de *Streptococcus pyogenes*, decât cu L-fucoza grupului 0. Ca urmare, anticorpii produşi de indivizii de grup A, după infecţia cu *Streptococcus pyogenes*, se cuplează cu antigenele tisulare care conţin antigene ale grupului A şi produc reacţii inflamatorii. Ţesutul cardiac conţine grupe moleculare, similare cu substanţa de grup A.

Anticorpii anti-streptococici se leagă cu antigenele înrudite (o reacţie încrucişată), ceea ce explică frecvenţa superioară a febrei reumatice la indivizii cu grup sanguin A şi B, faţă de indivizii cu grup sanguin 0.

Chorea (mişcări necontrolate) care însoţeşte febra reumatică, se poate explica prin asemănarea antigenelor streptococice cu unele molecule ale ganglionilor bazali, faţă de care se generează autoanticorpi.

Febra reumatismală debutează în momentul în care încep să se sintetizeze anticorpi antistreptococici. Absorbţia antigenelor streptococice în circulaţia sanguină, determină, în special, sinteza anticorpilor anti-streptolizină O (ASLO). Se formează complexe imune circulante. Rămâne neexplicat faptul că numai 2–3% dintre indivizii atinşi de infecţia cu *Streptococcus pyogenes* fac reumatism articular acut.

Ţesutul cardiac este adeseori implicat, deoarece anticorpii dau reacţie încrucişată cu antigenele streptococice şi cu antigenele de organ ale fibrei musculare striate din muşchiul cardiac şi chiar cu muşchiul neted din pereţii vasculari. Anticorpii anti-streptolizină O reacţionează cu sarcolema fibrelor musculare cardiace. O fracţie a anticorpilor anti-streptococici reacţionează încrucişat atât cu antigenele glucidice bacteriene, cât şi cu o proteină structurală de pe valvele cardiace. Complicaţiile pericardice, uneori consecutive infecţiei cu *Streptococcus pyogenes*, nu sunt explicate, pentru că în pericard nu s-au identificat până în prezent antigene cu specificitate încrucişată cu cele bacteriene.

Febra reumatică este complicaţia exclusivă a infecţiilor streptococice de tract respirator superior, dar nu este produsă de infecţiile streptococice tegumentare.

Scanned with OKEN Scanner

Răspunsul ASLO în infecţiile tegumentare este de mică intensitate, deşi tulpinile produc SLO in vitro, dar răspunsul umoral anti-hialuronidază, anti-DN-ază este amplu. Probabil că în infecţia tegumentară, SLO este inhibată de colesterol.

*Streptolizina S*

Este hemolizina stabilă la $O_2$ produsă de streptococii β-hemolitici pe plăcile cu geloză-sânge. Toxina este atât sub formă legată de membrana celulei bacteriene, cât şi sub forma complexului liber, asociată cu una sau câteva molecule purtătoare (ARN, albumină, alte proteine serice, iar *in vitro*, cu tween sau triton).

Componenta hemolitică este un polipeptid de 28 aminoacizi, sensibil la pronază şi la papaină. Moleculele neînrudite cu care polipeptidul hemolitic se complexează au rol de „purtător". Polipeptidul poate fi transferat de la o moleculă purtător la alta. Activitatea hemolitică este inactivată, fie prin inactivarea jumătăţii hemolitice, fie a purtătorului specific.

Hemoliza necesită contactul între celulele bacteriene şi eritrocit. SLS are activitate citotoxică pentru multe tipuri de celule eucariote şi organite celulare, pentru protoplaşti şi forme L. Liposomii formaţi din lecitină, colesterol şi diacetil-P sunt de asemenea lizaţi de SLS. Activitatea litică nu este inhibată de colesterol, ci de unele fosfolipide. De aceea, s-a conchis că efectele litice ale toxinei sunt rezultatul interacţiunii cu fosfolipidele membranare. SLS nu hidrolizează lecitina sau fosfatidil-etanolamina. După tratamentul cu SLS, eritrocitele se umflă, ceea ce denotă pierderea echilibrului ionic şi liza prin mecanism osmotic. Spre deosebire de SLO, SLS nu este imunogenă.

*Streptokinaza*

Este o proteină secretată de legare a plasminogenului, are gr. mol. 46 kDa şi are 4 domenii compacte. S-a demonstrat încă din 1933, că streptococii de grup A dizolvă cheagurile de fibrină. În final, activatorul fibrinogen plasmatic s-a dovedit a fi streptokinaza, care se leagă în raport de 1 la 1 cu plasminogenul şi converteşte alte molecule de plasminogen în plasmină. Anticorpii antistreptokinază neutralizează activitatea streptokinazei, în timp ce inhibitorii proteazici ai gazdei nu pot face acest lucru. Streptokinazele sunt o familie de proteine streptococice secretate cu funcţia comună de a converti plasminogenul în plasmină. Gena streptokinazei este prezentă la majoritatea izolatelor streptococice de grup A, ca una din nouă genotipuri polimorfice. Regiunile polimorfice ale streptokinazei cuprind aminoacizii de la 174 la 244 şi de la 270 la 290. Structura primordialp a moleculei (hidrofobă, hidrofilă, situsurile antigenice, regiunile amfipatice etc.) se menţine în ciuda existenţei polimorfismului din regiunile variabile. Activitatea streptokinazică a streptococilor reflectă spectrul de gazdă. Streptokinaza a fost asociată cu patogeneza glomerulonefritei poststreptococice acute. Regiunea variabilă majoră a streptokinazei este regiunea V1, care conţine 70 de aminoacizi. La izolatele

Scanned with OKEN Scanner

streptococice din glomerulonefrite poststreptococice acute, s-a raportat că regiunea V1 prezintă mai multe structuri secundare ordonate. Este posibil ca această regiune a streptokinazei să se poata lega la membrana glomerulara şi să activeze plasminogenul, generând astfel nefritele. Procesul de activare al plasminogenului de streptokinază poate să contribuie direct la virulenţa streptococică şi invazia ţesuturilor.

*Peptidaza C5a*

Este o enzimă proteolitică (endopeptidază) care se află pe suprafaţa streptococilor de grup A. Este o serinprotează de 130 kDa cu specificitate înaltă, ancorată în peretele celular streptococic. Peptidaza clivează chemotaxina C5a derivată din complement la situsul pentru legarea PMN. Acest fapt inhibă recrutarea celulelor fagocitice la locul infecţiei. De aceea, suprafaţa streptococilor de grup A prezintă o barieră dublă pentru sistemele de apărare ale gazdei prin intermediul complementului. Mai întâi proteina M inhibă activarea căii alternative şi apoi peptidaza streptococică C5a inactivează chemotaxia şi componenta C5a. Foarte recent s-a demonstrat că unitatea C5a activează polimorfonuclearele active faţă de streptococii M pozitivi. Deşi rezistenţi la fagocitoză în sângele uman proaspăt, s-a descoperit că streptococii M pozitivi sunt înglobaţi de celulele fagocitice activate.

*Peptidaza C5a* este codificată de o genă care este reglată împreună cu proteina M şi prezintă o secvenţă înalt conservată la serotipurile M I şi M II, ceea ce a condus la considerarea sa ca potenţial candidat la un vaccin antistreptococic.

Enzima este produsă de streptococii de grup A, B şi G izolaţi din diferite infecţii umane. Secvenţa de aminoacizi are omologie mai mare de 95% cu serotipurile proteice M, clasa I şi II, de la streptococii de grup A si B. Trei tipuri diferite de dovezi sugerează că peptidaza C5a are un rol major în virulenţa streptococilor de grup A. Mutaţii ale genei, scpA, amplifică eliminarea streptococilor din situsurile subepidermale de infecţie şi din mucoasa nasofaringiană a şoarecilor infectaţi nasofaringian. Oricum, aceste mutaţii nu au avut nici un efect asupra virulenţei în modelul infecţiei unui sac cu aer din piele de şoarece. Mai mult, imunizarea intranazală a şoarecilor a indus sinteza unui răspuns puternic cu anticorpi, care a amplificat eliminarea bacteriei din mucoasa bucală la şoarece. Deşi mai puţin de 15% dintre copiii sub 10 ani prezintă anticorpi antipepetidază C5a decelabili clinic, majoritatea adulţilor au urme de răspuns imun puternic la această proteină streptococică. Aceste descoperiri au condus la ipoteza că răspunsul imun la peptidaza C5a poate influenţa rezistenţa relativă a adulţilor la infecţie.

***Enterotoxinele produse de Escherichia coli***

*Escherichia coli* este o bacterie facultativ anaerobă, componentă a microbiotei colonului. Colonizează tractul intestinal la câteva ore după naştere, iar

Scanned with OKEN Scanner

raportul ulterior este reciproc benefic. *Escherichia coli* este limitată numeric la nivelul tractului intestinal, dar la gazdele imunosupresate sau sau în cazul unor disfuncţii ale barierelor gastrointestinale, tulpinile nepatogene pot produce infecţii datorită multiplicării masive sau translocaţiei. Unele tulpini de *Escherichia coli* pot produce infecţii chiar la indivizii normali. Infecţiile produse de tulpinile patogene de *Escherichia coli* pot fi limitate la suprafaţa mucoasei intestinale (manifestări gastro-intestinale) sau pot fi diseminate în organism (infecţii extra-intestinale). Se disting în principal 3 tipuri de sindroame clinice produse de tulpini de *Escherichia coli*: infecţii ale tractului urinar, sindrom meningean, maladia enterică diareică.

*Escherichia coli* este un agent infecţios important al patologiei digestive. Se cunosc 6 patovarietăţi: *ETEC* (*Escherichia coli* enterotoxigenă), *EIEC* (*Escherichia coli* enteroinvazivă), *EHEC* (*Escherichia coli* enterohemoragică), *EPEC* (*Escherichia coli* enteropatogenă), *EAEC* (*Escherichia coli* enteroaderentă de fenotip agregant) şi *DAEC* (*Escherichia coli* enteroaderentă de fenotip difuz).

După ce au aderat, strategiile patogenezei induse de tulpinile de *Escherichia coli* diareigenice sunt variabile: producerea *enterotoxinei* (ETEC, EAEC), invazia (EAEC), aderenţa intimă (EPEC şi EHEC).

Patogenitatea *tulpinilor ETEC* (enterotoxigene) se datorează sintezei *factorilor de aderenţă* care permit colonizarea colonului şi *secreţiei enterotoxinelor*.

*Enterotoxinele* sunt exotoxine cu GM mare *termolabile* (TL) sau cu gr. mol. mică, *termostabile* (TS). Ele sunt exprimate simultan sau independent, iar efectul lor este *citotonic*.

Enterotoxina LT şi toxina holerică (TC) au structură asemănătoare, cu o omologie de secvenţă de 80%, au acelaşi receptor celular şi aceiaşi activitate enzimatică.

Există două grupe serologice de enterotoxine TL: *LT-I*, produsă de tulpinile patogene pentru om şi animale şi *LT-II*, produsă de tulpinile izolate de la animale şi rareori de cele de origine umană. Cele două tipuri de toxine nu dau reacţie serologică încrucişată.

Enterotoxinele termolabile produse de *Escherichia coli*, ca şi toxina holerică, sunt toxine hexamere A-$B_5$.

Subunitatea B pentamerică a acestei toxine, care leagă monosialogangliozidul $GM_1$, este considerată ca vehicul pentru înglobarea şi internalizarea subunităţii A.

Enterotoxinele acţionează prin mesageri celulari secundari: AMPc, GMPc, $Ca^{2+}$. Toxinele cele mai bine cunoscute (LT I, TS a) recunosc receptori celulari (gangliozidul $GM_1$) ai suprafeţei celulare, cuplaţi cu enzima *adenilat-ciclază*, care hidrolizează ATP în AMPc sau cu *guanilat-ciclaza* care hidrolizează GTP în GMPc.

Nucleotidele ciclice (AMPc şi GTPc) activează protein-kinazele dependente de AMPc sau GMPc, care fosforilează diverse proteine implicate în permeabilitatea şi metabolismul celular. Celulele elimină o cantitate mare de apă şi electroliţi. Mecanismele absorbţiei glucozei, aminoacizilor şi Na, care le sunt cuplate, sunt

Scanned with OKEN Scanner

conservate şi fac posibilă rehidratarea pe cale orală. Acţiunea toxinei este stimulată de factorul ADP-ribozilant.

*Toxina LT-I* este o moleculă hexamerică de 86 kDa, alcătuită dintr-o subunitate A (28 kDa) şi 5 subunităţi identice B (11,5 kDa). Subunităţile B sunt aşezate sub forma unui inel şi se leagă ferm de gangliozidul $GM_1$. S-au identificat două variante: LT*p*-I (*p*orc) şi LT*h*-I (*h*uman), înrudite serologic.

Subunitatea A are acţiune enzimatică şi este clivată proteolitic în peptidele $A_1$ şi $A_2$, care rămân legate prin punţi S-S.

După legarea de membrana celulei sensibile, toxina este endocitată şi translocată, printr-un proces care implică transportul vezicular trans-Golgi. Ţinta acţiunii este *adenilat-ciclaza*, localizată pe membrana bazolaterală a celulei epiteliale intestinale polarizate.

Peptidul $A_1$ are activitate de ADP-ribozil-transferază şi acţionează prin transferul grupare *ADP-ribozil* de la NAD, la subunitatea α a proteinei Gs. Proteina Gs leagă GTP şi stimulează activitatea adenilat-ciclazei.

ADP-ribozilarea subunităţii Gsα face ca adenilat-ciclaza să fie permanent activată şi produce creşterea nivelului AMPc.

Protein-kinaza dependentă de AMPc este activată şi determină fosforilarea excesivă a canalelor de $Cl^-$ localizate în membrana apicală a celulelor epiteliale. Rezultatul net este secreţia ionului de $Cl^-$ din celulele criptice secretorii şi inhibiţia absorbţiei NaCl la nivelul celulelor vilozităţii. Creşterea conţinutului luminal de $Cl^-$ determină ieşirea pasivă a apei pe cale paracelulară, producând diareea osmotică. Timpul de *lag* necesar pentru acţiunea toxinei LT este de 15–60 de min.

Toxina LT şi TC produc efecte mai complexe. Ele induc sinteza şi eliberarea prostaglandinelor E ($PGE_1$ şi $PGE_2$) şi a leucotrienelor din acidul arachidonic. Sinteza lor poate stimula transportul electroliţilor şi creşterea motilităţii intestinale.

Alt mecanism implică sistemul nervos enteric, care reglează motilitatea şi secreţia ionilor.

Un al III-lea mecanism al acţiunii toxinei TL şi TC constă în activarea reacţiei inflamatorii enterice. Se sintetizează IL-6, activatoare a inflamaţiei şi se generează metaboliţii acidului arachidonic.

*Serovarianta TL-II* are identitate cu TL-I şi cu TC în proporţie de 55–57% pentru subunitatea A, dar nu are omologie pentru subunităţile B, iar receptorul este reprezentat de gangliozidul GD1.

Toxinele termostabile (TS) sunt mici, monomerice, conţin resturi multiple de cisteină, ale căror legături S-S le conferă termostabilitate. Sunt două clase de toxine TS, ce diferă prin structură şi mecanismul de acţiune.

*Toxina ST-I* (STa) este produsă de ETEC, de *Yersinia enterocolitica* şi de *Vibrio cholerae* non O1. Este un peptid de 18-19 aminoacizi (2 kDa). Sunt două variante: STp, produsă de tulpinile ETEC izolate de la porc şi STh, produsă de tulpinile izolate de la om. Ambele variante pot fi produse de ETEC umane. Cele două variante au 13 resturi identice, din care 6 Cys şi formează 3 punţi S-S.

Scanned with OKEN Scanner

Sta este sintetizată ca un precursor de 72 aminoacizi, clivat de peptidaza semnal şi rezultă un peptid de 53 aminoacizi, care este transportat în periplasmă, unde rezultă toxina matură cu 18–19 resturi de aminoacizi, eliberată prin difuzie pasivă prin membrana externă.

Receptorul major pentru *Sta* este *guanilat-ciclaza* C (GC-C), localizată în membrana apicală a celulelor epiteliului intestinal. Legarea ligandului de domeniul extracelular stimulează activitatea enzimatică intracelulară.

Hormonul mamalian *guanilina* este agonistul endogen pentru GC-C. Guanilina este un peptid de 15 aminoacizi, care conţine 4 resturi cys şi are o acţiune stimulatoare a GC-C inferioară Sta. Guanilina are rol în păstrarea homeostaziei intestinale, iar GC-C este o cale împrumutată de Sta.

Legarea Sta de GC-C stimulează activitatea GC şi produce creşterea GMPc în celulă. Activitatea crescută a GC stimulează secreţia $Cl^-$ şi inhibiţia absorbţiei NaCl, producând secreţia fluidului intestinal. Este activat canalul pentru $Cl^-$ şi ionii sunt secretaţi în lumenul intestinal. Datorită localizării apicale a receptorului, timpul de lag este scurt (câteva minute).

*STb* este produsă în primul rând de ETEC izolate de la porc, dar şi de unele tulpini izolate de la om. Este sintetizată ca o proteină precursoare de 71 aminoacizi, prelucrată la o secvenţă de 48 de resturi. Conţine 4 resturi Cys, legate prin două punţi S-S. Nu are omologie cu Sta.

Receptorul celular pentru STb nu este cunoscut. Ar putea să se lege nespecific de membrană, înainte de a fi endocitată. Produce leziuni histologice în epiteliul intestinal, ce constau în pierderea microvililor sau atrofia lor parţială.

Cu excepţia peptidului STb, enterotoxinele nu alterează celula, ci *amplifică mecanisme fiziologice* prin care se produce o pierdere masivă de hidroelectroliţi, datorită perturbării sistemelor de control ale enterocitului.

*Colicinele* au capacitatea de a forma canale ionice în membrana celulară, influenţând astfel procesele de transport ionic, depolarizarea membranei, depleţia rapidă a ionilor de K şi a ATP-ului cu perturbarea homeostaziei celulare. La Escherichia colicina are 3 domenii, cel activ fiind cel C-terminal, în timp ce domeniul N-terminal asigură translocaţia prin membrană, iar domeniul R se leagă de receptorul specific.

*Tulpinile EPEC* produc tulburări diareice la copii. Semnul distinctiv al patogenităţii EPEC este ataşarea şi dezorganizarea microvililor celulei epiteliale intestinale (leziune de tip A/E – attaching/effacing). Sub celula aderentă se produc modificări importante ale citoscheletului, ce constau în acumularea actinei polimerizate. Adeseori, bacteriile stau pe o structură piedestal-*like*, care se extinde ca un pseudopod, până la 10 μm la suprafaţa celulei.

Leziunea este diferită de cea produsă de *Vibrio cholerae*: vibrionul holeric nu aderă intim de membrană şi nu dezorganizează microvilii şi nici nu induce polarizarea actinei. Această observaţie a condus la elaborarea unei metode de diferenţiere (testul FAS – *fluorescent actin staining*). În acest test, faloidina

Scanned with OKEN Scanner

marcată cu fluorescein-izotiocianat (FITC) se leagă specific de actina filamentoasă în celulele epiteliale *in vitro*, chiar sub bacteria aderentă. La vârful piedestalului, sub membrana polară sunt localizate proteine fosforilate pe un rest de tirozina, ca răspuns la infecţia EPEC.

Tulpinile EPEC secretă *proteine cu rol de factori de virulenţă*, la contactul cu celulele sensibile *in vitro*, care se regăsesc în mediul de cultură. Proteinele denumite *Esp* (*E*PEC *s*ecreted *p*roteins) se sintetizează şi *in vivo*, deoarece la voluntarii infectaţi cu EPEC se sintetizează anticorpi specifici. Aceste proteine nu sunt enterotoxine, pentru că adăugarea proteinelor purificate nu este urmată de producerea efectelor citopatice asupra celulele epiteliale *in vitro*.

S-au identificat cel puţin 4 proteine secretate de EPEC: *EspA* (25 kDa), *EspB* (38 kDa), *EspC* şi *EspD* (40 kDa). Ele influenţează căile de transducere a semnalului celular: stimulează fosfolipaza C, induc sinteza inozitol-trifosfatului, mobilizarea depozitelor de $Ca^{2+}$ intracelular, fosforilarea tirozinei proteinelor gazdă şi rearanjarea citoscheletului. Mutaţiile genelor codificatoare (espA, espB, espD) anulează transducerea semnalelor activatoare în celulele epiteliale. EspC este omologă structural şi funcţional cu familia proteinelor autotransportoare, care include proteazele-IgA de *Neisseria gonorrhoeae* şi *Hemophilus influenzae*, proteina Tsh de *Escherichia coli* patogenă pentru păsări şi SepA de *Shigella flexneri*. Proteinele EspA, -B şi –D sunt traduse fără peptidul semnal.

EPEC posedă un sistem de secreţie de tip III, asemănător cu alte sisteme specializate de secreţie, de la alte bacterii Gram negative patogene pentru om, animale şi plante. Sistemele de secreţie de tip III determină secreţia şi translocaţia factorilor de virulenţă- ca proteinele *Ipa* (*I*nvasion *p*rotein *a*ntigens) la *Shigella*, proteinele *Yops* (*Y*ersinia *o*uter *p*rotein*s*) la *Yersinia* şi a proteinei cu rol în invazia celulelor de *Salmonella*.

La *Yersinia* sistemul de secreţie de tip III mediază transferul proteinei *Yop* direct în celula eucariotă. Un mecanism asemănător poate funcţiona la EPEC: EPEC ataşată injectează una sau mai multe proteine Esp (A, B, D), în celula epitelială.

Unele tulpini EPEC produc ST-I.

Pierderea amplă a microvililor absorbtivi la locul aderenţei poate produce diaree prin malabsorbţie. Perioada de incubaţie, între ingestia organismului şi atacul diareic, este scurtă (3 ore).

*Tulpinile EHEC* se disting de alte tulpini patogene de *Escherichia coli* prin aceea că produc o citotoxină care determină un efect citopatic profund şi ireversibil asupra celulelor Vero (rinichi de maimuţă verde africană). Ulterior s-a evidenţiat că că efectul citotoxic asupra celulelor HeLa este neutralizat de serul mun anti-toxină Shiga produsă de *Shigella dysenteriae*.

Tulpinile de *Escherichia coli* producătoare ale *toxinei Shiga* (STEC) sunt o cauză importantă a bolii umane gastrointestinale, care pot duce la complicaţii: colita hemoragică, sindromul hemolitic uremic. Verocitotoxina a fost purificată şi

Scanned with OKEN Scanner

caracterizată: structura şi activitatea biologică sunt foarte asemănătoare cu ale toxinei Shiga produsă de *Shigella dysenteriae* tip 1(Stx), iar cele două toxine dau reacţie serologică încrucişată.

Toxinele Stx se leagă de receptorii specifici (glicolipide, globotriaosilceramide), sunt endocitate pe calea veziculelor tapetate cu clatrină şi transportate de la nivelul aparatului Golgi, la reticulul endoplasmic şi la membrana nucleară.

Ulterior s-a evidenţiat existenţa a două variante antigenice de STEC: unele tulpini produc o toxină Shiga (Stx1) care reacţionează încrucişat cu Stx, iar toxina altor tulpini STEC (Stx2) nu este neutralizată de serul imun anti-Stx. O tulpină de EHEC poate produce numai Stx1, Stx2, ambele toxine sau variante multiple de Stx2. Cele două toxine sunt asemănătoare şi conţin două subunităţi: subunitatea A cu activitate enzimatică şi pentamerul subunităţii B. Subunitatea B se leagă de sfingoglicolipidul Gb3.

După înglobarea holotoxinei, subunitatea A este clivată proteolitic. Fragmentul A activat acţionează prin *depurinare*, ca şi toxinele plantelor (ricina) şi inactivează ribosomii prin depurinarea unui nucleotid al ARNr 28S. Este inhibată sinteza proteică şi celula moare. Efectul citotoxic se determină *in vitro*, asupra celulelor Vero şi HeLa. Celulele CHO sunt insensibile, datorită lipsei receptorului. Structura de bază este comună pentru toate toxinele familiei Shiga.

*Tulpinile EAEC* aderă de celulele HEp-2, ca şi tulpinile EPEC, dar fenotipul aderenţei lor este diferit. S-a descris aderenţa *localizată* (aglomerări de microcolonii pe suprafaţa celulelor Hep-2) pentru tulpinile EPEC, dar cele non-EPEC au alt fenotip al aderenţei – cea *difuză* (bacteriile aderente sunt dispersate pe suprafaţa celulelor HEp-2).

Fenotipul de aderenţă difuză s-a împărţit în două variante: *agregativă* şi *difuză* propriu-zisă. Aderenţa agregativă se distinge prin autoaglutinarea celulelor bacteriene.

Mecanismul patogenezei tulpinilor EAEC constă în creşterea secreţiei de către celulele mucoasei, iar bacteriile sunt prinse într-o peliculă de mucus. EAEC secretă o proteină membră a familiei de proteine autotransportoare, cu activitate enterotoxică.

*Tulpinile EIEC* au aceleaşi particularităţi de patogenitate ca şi cele de *Shigella*, pentru că ambele invadează epiteliul colonului. Tabloul secvenţial al patogenezei cuprinde următoarele etape:

- pătrunderea în celulele epiteliale;
- liza vacuolei endocitare;
- multiplicarea în citoplasmă;
- deplasarea orientată în citoplasmă, mediată de agregarea filamentelor de actină;
- extensia în celula epitelială adiacentă.

Dacă infecţia este severă, invazia celulelor epiteliale induce o reacţie inflamatorie intensă, manifestată prin ulceraţie.

Scanned with OKEN Scanner

Genele codificatoare ale factorilor de invazivitate se găsesc pe plasmide (pInv). Proteinele de invazie Ipa (*I*nvasion *p*rotein *a*ntigens) A, B, C, D sunt secretate prin aparatul de tip III.

Infecţiile produse de *EIEC şi Shigella* se caracterizează prin diaree apoasă. Ambele produc o *enterotoxină* codificată de o genă plasmidială.

Mecanismul patogen al *tulpinilor DAEC* nu se cunoaşte.

*Shigella dysenteriae* este un bacil Gram negativ, facultativ anaerob, nesporulat, imobil. Nu produce $H_2S$. Se transmite prin apă, alimente, în condiţii igienico-sanitare precare. Traversează rareori bariera intestinală, dar produce inflamaţia mucoasei ileale şi a colonului.

Deplasarea *Shigella* în citoplasma celulei epiteliale este mediată de condensarea actinei, ce se extinde de la un pol al bacteriei. Pe măsură ce actina este adăugată la această structură, bacteria este propulsată pasiv în citoplasmă, în direcţie laterală.

*Shigella dysenteriae* după liza celulei, eliberează endotoxina, dar secretă o exotoxină puternică, *toxina Shiga*, care produce 3 tipuri de efecte majore:

– injectată la şoareci sau la iepuri produce paralizia membrelor posterioare şi respectiv anterioare. Toxina nu produce efecte neuronale directe, ci acţionează asupra vaselor din SNC, paralizia fiind un efect secundar;
– citotoxicitate asupra celulelor mamaliene *in vivo* şi *in vitro*;
– activitate enterotoxică, deoarece produce secreţia de fluid în ansa ileală de iepure.

Ca şi în cazul toxinelor tetanică şi difterică, sinteza toxinei Shiga este stimulată de limitarea concentraţiei Fe în mediu.

*Structura.* Toxinele familiei Stx sunt compuse: molecula activă (holotoxina) are circa 70 kDa şi este alcătuită dintr-o subunitate A (32 kDa) şi o subunitate B multimerică (monomeri de 7,7 kDa), cu rol de legare a toxinei de receptorii glicolipidici specifici de pe suprafaţa celulelor sensibile. Studiile de cristalografie cu raze X au arătat că subunităţile B formează un inel pentameric în jurul regiunii helicale C-terminale a subunităţii A. Secvenţa de 9 aminoacizi nepolari (279-287) este esenţială pentru asamblarea complexului molecular: cele 9 resturi formează un α-helix ce pătrunde în inelul format de cele 5 subunităţi B.

După ce a traversat bariera epitelială şi a intrat în torentul sanguin, Stx se fixează pe celulele care exprimă receptorul glicolipidic adecvat.

*Receptorul* suprafeţei celulei eucariote pentru toxinele familiei Stx este un *glicolipid*. Subunitatea B mediază legarea toxinei de globotriosilceramida ($Gb_3$): Gal-Gal-Glc-ceramida. Excepţia este Stx2 care recunoaşte preferenţial globotetraosilceramida ($Gb_4$): GalNac-Gal-Gal-Glc-ceramida.

Niveluri înalte de $Gb_3$ se găsesc în rinichiul uman (în special în regiunea corticală), situsul principal al leziunilor la pacienţii cu sindrom hemolitic uremic produs de STEC. Toxina se leagă în principal de regiunea distală contortă a tubilor renali.

Scanned with OKEN Scanner

După legarea de membrana celulară, moleculele de toxină sunt internalizate prin mecanismul endocitozei mediată de receptor. Internalizarea are loc prin formarea unei vezicule membranare tapetată cu clatrină*, care ulterior se desprinde şi formează o veziculă închisă tapetată, toxina fiind legată pe faţa internă.

* *Clatrina* este o proteină mare, oligomerică, ce formează o reţea pe suprafaţa internă a membranei plasmatice, favorizând intruzia membranei şi formarea unei vezicule tapetată cu reţeaua moleculară, care ulterior poate fuziona cu alte organite celulare.

Traficul celular ulterior al toxinei este decisiv pentru *efectele biologice ale Stx*. În unele celule, veziculele care au internalizat toxina fuzionează cu lizosomii şi toxina este degradată. În celulele foarte sensibile la acţiunea Stx, veziculele endocitoză care conţin complexele toxină-receptor sunt transportate retrograd via aparatul Golgi, spre reticulul endoplasmic, înainte de a fi translocate în citosol. În acest timp, subunitatea A este clivată sub acţiunea unei proteaze legată de membrană (furin) şi generează fragmentul A1 N-terminal de 27 kDa, cu activitate catalitică şi fragmentul A2 C-terminal. Cele două fragmente rămân legate printr-o punte S-S. Ulterior, puntea S-S este redusă şi eliberează componentul activ A1.

Fragmentul A1 are activitate ARN N-glicozidazică şi clivează specific legătura N-glicozidică a ARNr 28 S. Aceiaşi proprietate o are *ricina*, o toxină din seminţele de ricin. Clivajul nu mai permite legarea aminoacil-ARNt (dependentă de ef-1 (elongation factor), de subunitatea ribosomală 60 S. Consecinţa este inhibiţia treptei alungirii lanţului peptidic a sintezei proteice şi moartea celulei.

Sensibilitatea celulelor la toxina Shiga nu este determinată numai de conţinutul total de $Gb_3$. Componenta lipidică a lui $Gb_3$ are o influenţă semnificativă asupra interacţiunii oligozaharidului cu toxina. Stx1 are afinitate optimă pentru $Gb_3$ cu un acil gras cu lungimea de 20–22 atomi de C, iar pentru Stx2, afinitatea este optimă faţă de lanţul cu lungimea de 18 C.

Sinteza Stx1 de către celulele *Escherichia coli* şi *Shigella dysenteriae* este represată de prezenţa Fe şi de temperatura scăzută.

### *Toxinele produse de Yersinia*

*Yersinia* sintetizează un set de circa 12 proteine, denumite *Yops* (*Y*ersinia *o*uter *p*rotein*s*), codificate de o plasmidă. Majoritatea genelor *yop* s-au identificat şi secvenţiat şi sunt aproape identice la cele 3 specii de *Yersinia: Yersinia pestis* – produce plaga bubonică; *Yersinia pseudotuberculosis* – produce adenita mezenterică şi septicemie; *Yersinia enterocolitica* – produce sindromul gastrointestinal, de la enterita acută, la limfadenita mezenterică.

Proteinele *Yop* s-au descris iniţial ca proteine ale membranei externe, dar se găsesc şi în supernatantul culturii, deoarece pot fi secretate. Secreţia se face pe calea de tip III şi necesită un aparat specific – *Ysc* (*Y*op *sc*retion). Pentru a stimula secreţia *Yop*, *Yersinia* este crescută la 28°C în mediu fără Ca şi ulterior se transferă

la 37°C. Transcrierea genelor *yop* este controlată de absenţa Ca sau de contactul cu o celulă eucariotă şi de temperatură.

*Yops* se detectează iniţial în supernatant şi ulterior în fracţia membranară. Apariţia în fracţia membranară este concomitentă cu scăderea concentraţiei în supernatant.

Secreţia *Yops* este declanşată de aderenţa celulei bacteriene pe suprafaţa celulei eucariote şi este polarizată, adică majoritatea moleculelor efectoare *Yop* sintetizate, sunt orientate în citosolul celulei eucariote (nu în mediul extern), prin sistemul de secreţie de tip III. Translocaţia proteinelor *Yops* este orientată sau polarizată.

Printre cele 12 proteine Yop secretate, numai două au domenii hidrofobe, sugerând că ele pot interacţiona cu membranele.

Efectul citotoxic al *Yops* constă în rotunjirea celulelor şi detaşarea de suport. Citotoxicitatea se datorează ruperii microfilamentelor de actină şi dezorganizării citoscheletului celulei ţintă.

### *Toxinele produse de Campylobacter*

*Campylobacter jejuni* este cea mai comună cauză bacteriană a maladiei diareice infecţioase la om. Se izolează cu o frecvenţă mare, de la copii bolnavi, dar şi sănătoşi. Agentul infecţios produce două tipuri de maladii diareice: diareea inflamatorie, însoţită de febră, adeseori sanguinolentă, cu leucocite şi diaree neinflamatorie, apoasă, fără leucocite.

Patogenitatea *Campylobacter jejuni* este condiţionată de 4 factori de virulenţă: motilitate, aderenţă, invazivitate şi toxigenitate.

Toxigenitatea este considerată ca un factor major al patogenezei. Toxinele de natură proteică cu rol semnificativ pentru enteropatogenitatea *Campylobacter* au fost grupate în două clase, în funcţie de modul de acţiune: *enterotoxine* şi *citotoxine*.

Activitatea *enterotoxinei* de *Campylobacter jejuni* s-a evidenţiat în testul ansei ligaturate de iepure, prin acumularea intraluminală a lichidului, iar alungirea celulelor CHO (*Chinese Hamster Ovary*) a fost însoţită de creşterea nivelului intracelular de AMPc.

Activitatea enterotoxinei de *Campylobacter jejuni* a fost neutralizată de serul anti-toxină cholerică şi anti-toxină termolabilă de *Escherichia coli*, ceea ce evidenţiază asemănarea serologică a acestor molecule. Surprinzător, deşi omologia serologică este evidentă, nu s-a evidenţiat omologie a genei codificatoare a enterotoxinei de *Campylobacter jejuni*, cu genele care codifică toxina cholerică şi toxina termolabilă de *Escherichia coli*. Activitatea maximă a enterotoxinei în supernatant se înregistrează în culturi aflate la începutul fazei staţionare.

Scanned with OKEN Scanner

Adăugarea fierului feric (sub forma clorurii ferice) creşte atât cantitatea, cât şi numărul tulpinilor pozitive pentru producerea enterotoxinei. Filtratele de cultură sunt mai intens pozitive pentru enterotoxină, după tratamentul cu polimixină B, probabil pentru că toxina este localizată în periplasmă şi polimixina B produce liza celulelor.

În funcţie de tulpina bacteriană, de condiţiile de creştere şi de substratul celular utilizat pentru evidenţierea activităţii toxice, se propune existenţa a 6 citotoxine diferite: o citotoxină de 70 kDa activă asupra celulelor Vero; o citotoxină activă asupra celulelor Vero şi HeLa; o toxină citoletală care produce distensia celulelor (CDT); o citotoxină neutralizată de serul imun anti-toxină Shiga; o citotoxină cu activitate hemolitică; o hepatotoxină. Criteriile diferenţierii acestor toxine sunt specificitatea de acţiune faţă de substrat, care este reproductibilă şi greutatea moleculară a toxinei purificate.

*Citotoxina de 70 kDa* are activitatea toxică asupra celulelor HeLa, HEp-2, dar nu faţă de celulele Vero. Are gr. mol. 30 kDa. *Citotoxina* activă asupra celulelor Vero/HeLa nu este neutralizată de serul anti-toxină Shiga. *Toxina citoletală* care dilată celulele (CDT) este activă faţă de celulele CHO, HeLa, Hep-2. Toxina induce creşterea nivelului de AMPc şi alungirea celulelor CHO, efecte identice cu acelea ale enterotoxinei, după 24 ore de incubare. După o incubare prelungită (2–4 zile) volumul celulelor creşte şi efectul este letal, ceea ce contrastează cu efectul enterotoxinei. Toxina asemănătoare *toxinei Shiga* este neutralizată de serul anti-toxină Shiga. *Citotoxinele hemolitice* s-au detectat pe agar-sânge la tulpinile de *Campylobacter jejuni* cultivate la 42°C timp de 4 zile. Hemoliza apare în jurul coloniilor îmbărânite şi este probabil produsă de un component intracelular eliberat prin liza celulară. Iniţial hemoliza este incompletă (de tip α), dar după 6 zile de incubare hemoliza este completă (tip β).

*Hepatotoxina* s-a evidenţiat după injectarea la iepure, a fracţiei brute obţinută prin sonicarea celulelor de *Campylobacter jejuni*.

### *Toxina difterică*

Difteria este o infecţie localizată a tractului respirator superior produsă de *Corynebacterium diphteriae*, a cărui virulenţă este determinată în exclusivitate de secreţia *toxinei difterice*. Exotoxina este eliberată în focarul primar al infecţiei, ajunge în mediul intern şi produce efecte sistemice. În stadiile primare, toxina favorizează invazivitatea prin distrugerea celulelor epiteliale şi a celulelor inflamatorii fagocitare.

Toxina difterică este sintetizată numai de bacteriile *lizogenizate de un virus* specific. Toxina este codificată de o genă structurală fagică (tox$^{+}$). Gena *tox* poate să se exprime în timpul multiplicării fagului şi chiar când fagul se găseşte în celulă sub forma fagului vegetativ, ca genom liber, nereplicativ şi neintegrat.

Scanned with OKEN Scanner

Microbiota indigenă din faringe, la om, conţine corinebacterii difteromorfe care nu sintetizează toxina, dar care pot deveni toxice după ce sunt lizogenizate de fag.

Difteria este o maladie care presupune, pe de o parte, interacţiuni complexe între organismul uman şi cel infecţios, iar pe de altă parte, între celula bacteriană şi fagul lizogenizant. Sinteza toxinei nu este relevantă pentru supravieţuirea celulei şi nici pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare virală.

Toxina difterică este sintetizată sub forma unui polipeptid de 62 kDa. Molecula intactă are 2 punţi S-S (fig. 16). Una dintre ele conectează o buclă sensibilă la tripsină. Sub acţiunea tripsinei rezultă *fragmentul A* (24 kDa) şi *fragmentul B* (36 kDa), separabile prin cromatografie.

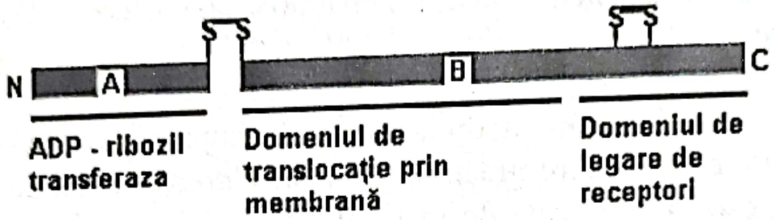



Fig. 16 – Modelul structural al toxinei difterice.

Studiile de cristalografie au sugerat că molecula este organizată în 3 domenii (fig. 17):

– domeniul catalitic N-terminal (aminoacizii 1-193);
– un domeniu intern de translocaţie (aminoacizii 205-378);
– domeniul C-terminal, ce se leagă de receptorul celular (resturile 386-535).

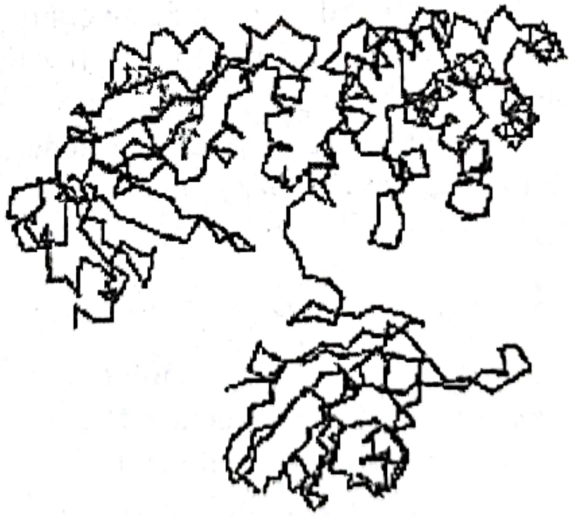


Fig. 17 – Cele 3 domenii ale toxinei difterice evidenţiate prin metoda cristalografiei.

Toxina difterică produce efect citopatic asupra culturilor celulare primare şi stabilizate ale primatelor. Prin studii *in vitro* pe celule HeLa, s-a demonstrat că toxina difterică *inhibă sinteza proteinelor*.

Scanned with OKEN Scanner

După legarea de receptorul celular (neidentificat), toxina este înglobată prin două mecanisme: pinocitoză nespecifică şi pinocitoză mediată de receptori. Majoritatea proteinelor endocitate sunt digerate sub acţiunea hidrolazelor acide, după fuziunea cu lizosomii primari. Uneori, proteinele pinocitate scapă digestiei şi astfel proteinele toxice, aşa cum este cazul toxinei difterice, traversează membrana endosomului şi ajung în citoplasmă, unde îşi exercită toxicitatea potenţială.

Toxina dobândeşte accesul la constituienţii citoplasmatici printr-un proces care evită aparatul digestiv al celulei. Mediul acid al endosomului stimulează protonarea câtorva aminoacizi localizaţi în domeniul de translocaţie, ceea ce favorizează trecerea toxinei prin membrana endosomului. În mediul neutru al citosolului, aminoacizii se deprotonează.

*Mecanismul de acţiune*. După ce traversează membrana, toxina acţionează enzimatic asupra EF-2 (factorul 2 de elongaţie a catenei polipeptidice), una dintre enzimele citosolice (solubile) necesare sintezei peptidelor pe ARNm al tuturor celulelor eucariote. Celulele procariote nu au această enzimă şi sunt aşadar rezistente la acţiunea toxinei.

Concentraţia scăzută de ioni de $NH_4^+$ protejează celulele sensibile de acţiunea toxinei difterice, deşi ionii nu par să inhibe legarea toxinei de membrana celulei şi nici activitatea catenei A în sisteme acelulare. $NH_4^+$ inhibă specific penetrarea toxinei difterice prin membrana celulei.

Celulele rezistente la toxină nu sunt lipsite de capacitatea de a internaliza toxina. *In vitro*, atât celulele sensibile (HEp-2) cât şi cele rezistente (L-929) adsorb toxina iodată (cu $I^{125}$) cu o rată semnificativă într-un interval foarte scurt de 3 ore. Celulele rezistente adsorb şi înglobează cantităţi mai mari de toxină, comparativ cu celulele sensibile. Diferenţa între rezistenţă şi sensibilitate rezidă în destinaţia ulterioară a toxinei: în celulele rezistente, întreaga cantitate de toxină este hidrolizată sub acţiunea enzimelor lizosomale; în celulele sensibile, rămân molecule active, nedigerate, care trec în citosol şi produc efectul toxic. Este suficient un număr mic de molecule pentru a omorî celula.

În sistemele acelulare, inhibiţia sintezei proteinelor este dependentă de prezenţa NAD-ului. Toxina posedă o activitate enzimatică unică şi catalizează următoarele reacţii (fig. 18):

$$\text{EF-2} + \text{NAD} \longrightarrow \underset{\substack{\text{EF-2 legat covalent cu}\\ \text{adenozin-difosfat-riboza}\\ \text{din NAD. EF-2 legat}\\ \text{este inactiv.}}}{\text{ADPR-EF-2}} + \text{nicotinamida} + H^+$$

Reacţia catalitică este unică, deoarece toxina nu acţionează asupra substratului NAD în absenţa EF-2, iar activitatea enzimatică este asociată numai cu fragmentul A.

Scanned with OKEN Scanner

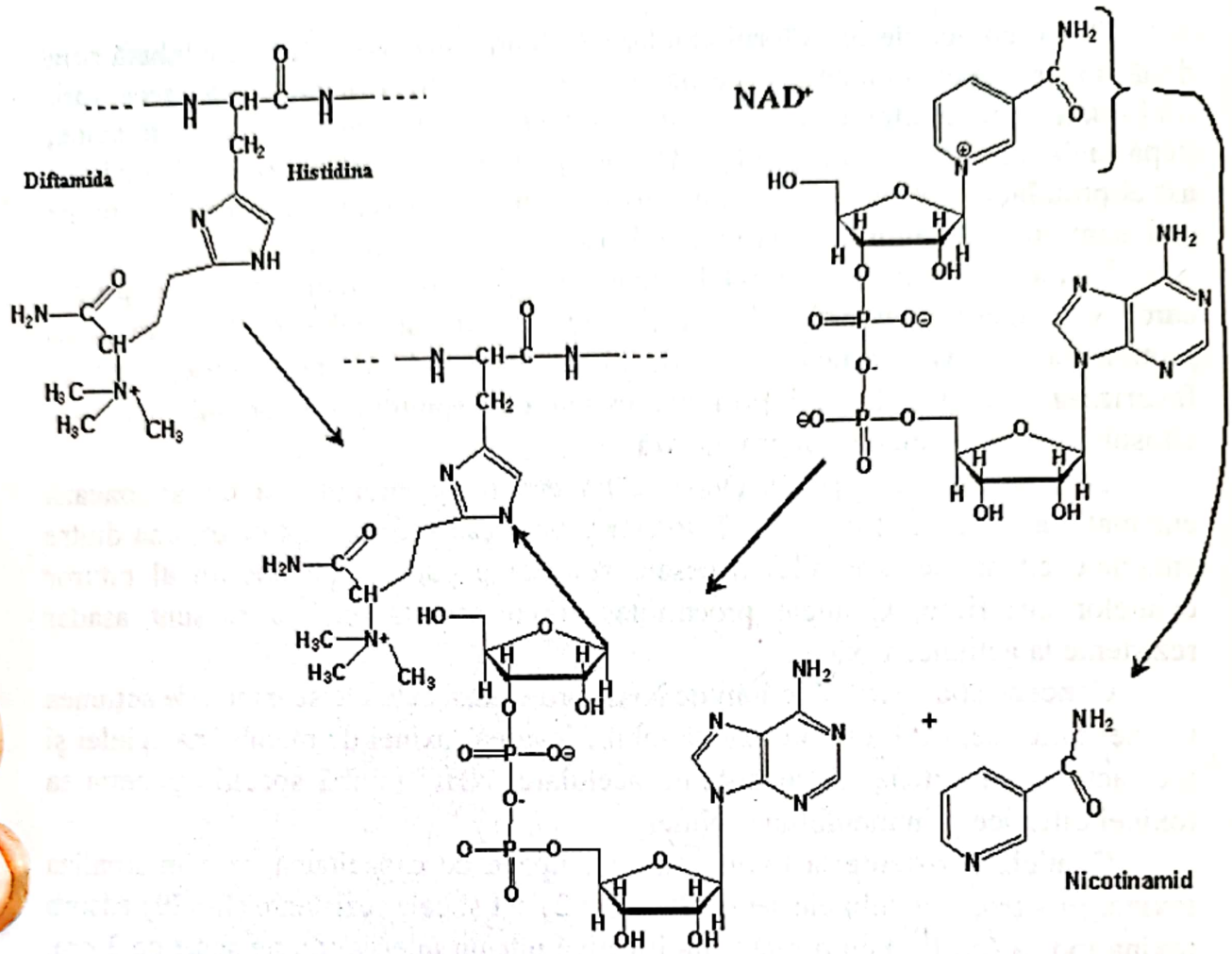



Fig. 18 – Reprezentarea mecanismului de acţiune a toxinei difterice.

### *Toxinele produse de Bordetella pertussis*

*Bordetella pertussis* este un cocobacil Gram negativ, care produce o maladie respiratorie acută sau cronică, denumită *tuse convulsivă* (pertusis), la copiii de până la 12 ani.

Infecţia cu *Bordetella pertussis* a reprezentat o cauză majoră a morbidităţii şi mortalităţii copiilor, până la introducerea vaccinului celular în anii '40, care a determinat o scădere foarte accentuată a incidenţei maladiei. Deşi este considerată ca o maladie infecţioasă a copilăriei, adulţii pot fi infectaţi într-o proporţie importantă. Infecţia are cea mai înaltă mortalitate la copiii sub 6 luni. Complicaţiile infecţiei pot avea un tablou clinic variabil cu un grad de severitate mediu (înroşire, edem, febră) sau mare. Cazurile severe implică aparatul respirator sau SNC. Vaccinul celular atenuat poate produce uneori acelaşi set de complicaţii.

*Bordetella pertussis* este o bacterie infecţioasă numai pentru om, care constituie şi singurul rezervor. Este foarte contagioasă, cu o rată de propagare de peste 90% la persoanele neimunizate. De la individul infectat, agentul se propagă pe calea aerosolilor.

Scanned with OKEN Scanner

*Bordetella pertussis* posedă un set larg de factori de virulenţă, cu activităţi biologice variate, care-i conferă patogenitate, între care o serie de exotoxine.

Toxina pertussis are o organizare structurală de tip A-B şi este secretată ca o proteină oligomerică alcătuită din 6 subunităţi, dintre care 5 sunt diferite (S1, 2, 3, 4, 5), raportul fiind 1:1:1:2:1 (fig. 19).

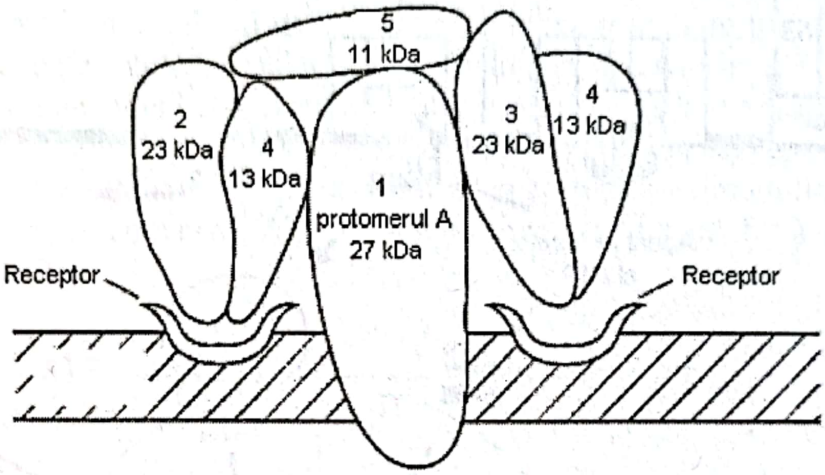



Fig. 19 – Modelul structural al toxinei pertussis.

Toxina pertussis are rol important în inducerea imunităţii faţă de infecţia cu agentul patogen, ceea ce a justificat cercetările orientate în direcţia unui vaccin *acelular* protector faţă de infecţia cu *Bordetella pertussis*. Anticorpii anti- toxină pertussis sunt protectori şi de aceea, vaccinul a inclus o formă detoxifiată a toxinei. Vaccinul *Bordetella pertussis* de generaţia a II-a conţine toxina formolizată, asociată cu alţi factori de virulenţă prezenţi la *Bordetella pertussis*, reprezentaţi de FHA, pertactina şi fimbrii de tip 2.

Toxina *pertussis* catalizează *ADP-ribozilarea* subunităţii α a unui set de *proteine heterotrimerice* (fig. 20), care leagă GTP, dar ţinta preferată este proteina G, alcătuită din subunităţile α, β, γ. Proteinele din familia G ($G_i$, $G_o$, $G_t$) sensibile la acţiunea ADP-ribozilantă a toxinei au o caracteristică comună: un rest de cisteină localizat foarte aproape (la 4 aminoacizi) de capătul C terminal al proteinei Gα este situsul ADP-ribozilării. ADP-ribozilarea lui Gα întrerupe interacţiunea proteinei G cu receptorul. Proteinele G sensibile la acţiunea toxinei pertusice sunt asociate membranei citoplasmatice, dar unele (familia Gi) sunt localizate în membrana golgiană.

*Componenta B* este formată din restul moleculei: S2, S3, $(S4)_2$ şi S5. Rolul ei este de a lega toxina la receptorii celulari specifici, făcând posibil accesul componentei A la situsul specific al acţiunii. Oligomerul B stimulează mitoza limfocitelor (fig. 20).

Toxina pertussis produce o largă varietate de activităţi biologice *in vivo*: leucocitoză, limfocitoză, stimularea secreţiei de insulină cu efect hipoglicemiant, stimularea sintezei de IgE, eliberarea de histamină şi creşte sensibilitatea organismului la endotoxine. Toxina pertussis inhibă numeroase funcţii ale leucocitelor (chemotaxia,

Scanned with OKEN Scanner

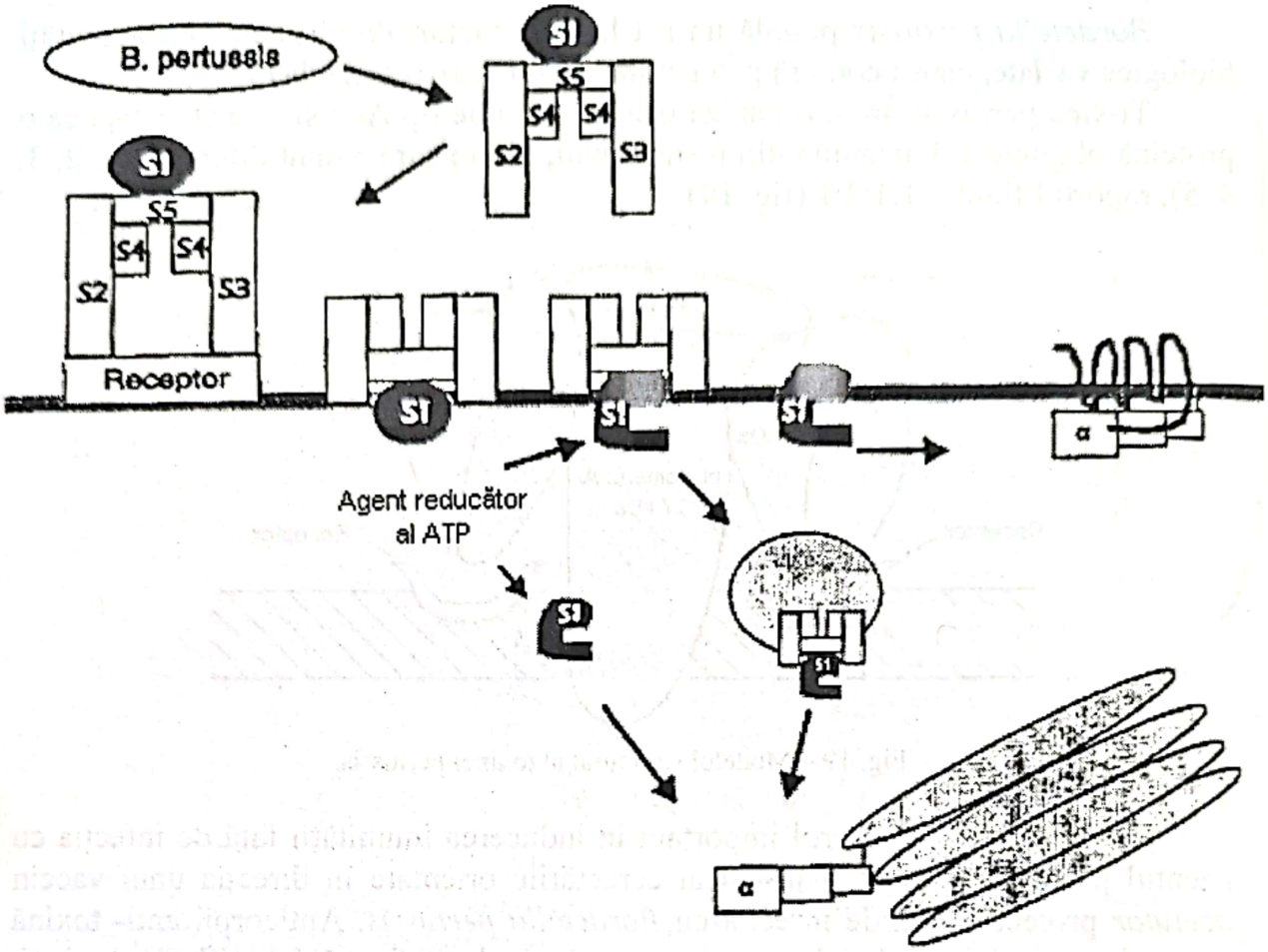



Fig. 20 – Reprezentarea schematică a modelului de a acţiune a toxinei pertusice (după Faruque şi colab., 2001).

fagocitoza, activitatea citotoxică a NK). Are efect mitogen şi efect imunoadjuvant. Aceste efecte se datorează pe de o parte activităţii mitogene a subunităţii B şi pe de altă parte, activităţii enzimatice adenozin 5'-difosfat-ribozilante a subunităţii A.

Toxina pertussis este secretată ca proenzimă, cu efecte citotoxice *in vivo*, dar inactivă *in vitro*. Activarea *in vitro* necesită un agent reducător şi ATP. ATP nu este hidrolizat, deoarece pentru stimularea activităţii toxinei este suficient numai polifosfatul.

Toxina pertussis se leagă de componenta glucidică a receptorilor celulei eucariote, în special de acidul sialic al unor glicoproteine şi glicolipide. Componenta activă pătrunde în celulă pe două căi:

- subunitatea activă ($S_1$) poate intra direct prin inserţia în membrana citoplasmatică, componentele oligomerului B având rol în translocaţia componentei active;
- toxina este înglobată prin pinocitoză. $S_1$ se eliberează din holotoxină şi difuzează în membranele celulare.

Sub acţiunea proteazelor, o secvenţă a lui $S_1$ este preferenţial clivată şi se generează un fragment cu activitate enzimatică de ADP-ribozil-transferază.

Scanned with OKEN Scanner

Datorită activității ADP-ribozilante, toxina determină acumularea AMPc în celulele epiteliale, cu creşterea secreției de mucus şi alterarea consecutivă a funcțiilor normale ale celulelor epiteliale.

Pe lângă toxina pertussis, *Bordetella pertussis* secretă şi alte toxine cu rol în fiziopatologia tusei convulsive.

*Adenilat-ciclaza* (AC) este activată de calmodulină, se acumulează la nivel maxim în supernatantul culturii de 24 de ore, dar cea mai mare parte a activității AC este extracitoplasmatică, asociată cu suprafața celulei bacteriene.

Activarea unei adenilat-ciclaze a celulei procariote de către *calmodulină* – o proteină reglatoare a eucariotelor – este neobişnuită, cu excepția factorului edematos al lui *Bacillus anthracis*, activat de asemenea de o calmodulină.

AC determină conversia ATP la AMPc care este un inhibitor al funcțiilor fagocitelor (fig. 21).

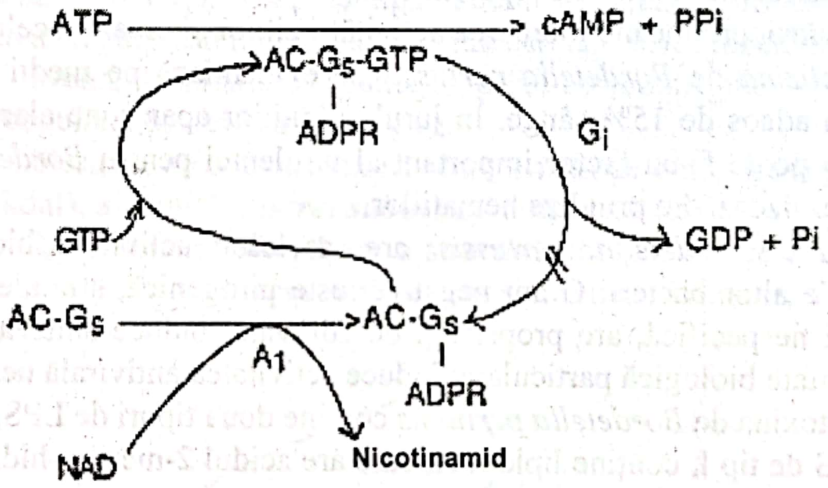



Fig. 21 – Ilustrarea modelului de acțiune a adenilat ciclazei pertusice.

Extractul celular (cu uree) inhibă activitatea PMN umane (chimiotaxia şi consumul de $O_2$) şi celulele NK, induce acumularea AMPc (adenozin 3'–5' fosfat) la niveluri înalte în diferite tipuri celulare: PMN, limfocite, monocite, CHO etc.

Adenilat-ciclaza poate avea un rol important în patogeneză, deoarece inhibă apărarea nespecifică traheo-bronşică a gazdei, favorizând supraviețuirea şi multiplicarea bacteriei, urmată de producerea maladiei.

*Citotoxina traheală* este un glicopeptid mic, monomeric, cu structură peptidoglican-*like* care se leagă de epiteliul ciliat al mucoasei traheo-bronşice şi produce ciliostaza şi leziuni specifice ale celulelor ciliate, evidențiate prin studii *in vitro* pe culturi traheale de hamster. Celulele ciliate sunt sediul ataşării şi inițierii infecției cu *Bordetella pertussis*. Bacteriile rămân localizate la nivelului focarului primar şi se multiplică, producând liza celulelor ciliate, mediată probabil de citotoxină. Toxina este un factor major de virulență, deoarece liza celulelor ciliate

inv. 57742

Scanned with OKEN Scanner

împiedică îndepărtarea mucusului, a resturilor celulare şi a bacteriilor, producând tusea ca modalitate de curăţire a mucoaselor respiratorii.

Din punct de vedere chimic, citotoxina traheală este asemănătoare peptidoglicanului bacteriilor Gram negative: conţine acid diaminopimelic, acid muramic, alanină, acid glutamic şi glucozamină. Are gr. mol. 1235–1400 Da.

*Bordetella pertussis* eliberează un set omogen de fragmente solubile de peptidoglican, identice cu citotoxina traheală. Fragmentele de mureină se pare că îşi au originea în hidroliza peptidoglicanului şi nu provin prin eliberarea precursorilor acestuia.

O situaţie asemănătoare este cunoscută pentru *Neisseria gonorrhoeae*, o bacterie patogenă Gram negativă care colonizează suprafeţele mucoase ale tractului urogenital. *Neisseria gonorrhoeae* eliberează cantităţi mari de fragmente mici de peptidoglican (monomeri) produşi de o transglicozilază gonococică. Monomerii peptidoglicanici au toxicitate specifică faţă de celulele ciliate ale trompei lui Fallope *in vitro*, producând pierderea activităţii cililor şi moartea celulelor.

*Hemolizina* de *Bordetella pertussis* se evidenţiază pe medii solidificate cu agar, cu un adaos de 15% sânge. În jurul coloniilor apar zone clare de hemoliză. Hemolizina poate fi un factor important al virulenţei pentru *Bordetella pertussis*, deoarece furnizează Fe prin liza hematiilor.

*LPS* de *Bordetella pertussis* are aceleaşi activităţi biologice ca şi endotoxinele altor bacterii Gram negative: este pirogenică, stimulează imunitatea specifică şi nespecifică, are proprietăţi de adjuvant, induce sinteza interferonilor. Are o activitate biologică particulară: induce activitatea antivirală nespecfică.

Endotoxina de *Bordetella pertussis* conţine două tipuri de LPS:

– LPS de tip I, conţine lipidul X, care are acidul 2-metil-3-hidroxidecanoic şi -tetradecanoic;

– LPS de tip II, conţine lipidul A şi două polizaharide diferite (1 şi 2).

Lipidul X induce toate activtăţile biologice: este pirogenic, sensibilizant şi toxic, iar lipidul A este mai puţin pirogen, toxic dar este adjuvant şi antiviral.

*Toxina dermonecrotică* este o toxină termolabilă (fiind inactivată la 56°C, timp de 10 minute). Produce inflamaţie şi leziuni necrotice ale tegumentului după injectare subcutană în doze mici la şoarece, dar la doze mari este letală. Este localizată intracelular. Este alcătuită din 4 catene polipeptidice (identice două câte două). În rinichiul de şobolan, toxina inhibă pompa Na-K (ATP-ază).

### *Toxina holerică şi toxinele accesorii produse de Vibrio cholerae*

Holera este un sindrom clinic produs de *Vibrio cholerae*, aparţinând serogrupurilor O1 şi O139. In forma gravă, maladia clinică este caracterizată prin diaree apoasă şi/sau vomă, însoţită de deshidratare masivă şi rapidă, şoc hipovolemic, acidoza şi moartea în absenţa rehidratării rapide.

Scanned with OKEN Scanner

*Vibrio cholerae* provoacă leziuni tisulare foarte limitate sau acestea lipsesc complet, dar sintetizează o varietate de produse extracelulare care modifică echilibrul hidroelectrolitic al celulei eucariote.

Deshidratarea diareică a organismului este produsă de *toxina holerică*, denumită şi *choleragen*.

Datorită existenţei unor asemănări structurale şi funcţionale între toxina holerică şi unii hormoni glicoproteici (tirotropina, hormonul luteinizant, hormonul corionic gonadotropinic, hormonul stimulator al foliculinelor), se consideră că gena *tox* de la *Vibrio cholerae* ar putea proveni din încorporarea accidentală a unei gene eucariote (pentru unii hormoni) în genomul bacterian, fapt, teoretic, realizabil prin intermediul unui virus. Collier (1975), bazat pe faptul că o proteină toxică eliberată de *Escherichia coli* reacţionează încrucişat cu toxina holerică, pledează pentru ipoteza unui transfer de gene între cele două specii, în intestin. În sfârşit, Richard şi Douglas (1978) nu exclud posibilitatea ca, la origine, toxina holerică să fi provenit dintr-o proteină iniţial normală, de tipul adenilat ciclazei, produsă de celulele bacteriene. Ea ar fi suferit o mutaţie la o formă care modifică metabolismul gazdei, conferindu-i, eventual, anumite avantaje, care au contribuit la stabilirea ei definitivă în populaţia bacteriilor respective.

Toxina holerică este o enterotoxină reprezentată de o moleculă proteică mare (gr. mol. 82 kdal), alcătuită din *trei subunităţi* notate A1 (96 aa), A2 (240 aa) şi B (103 aa) (fig. 22). Toxina holerică are o structură complicată, ce decurge atât din interacţiunile diferitelor părţi componente, cât şi din necesitatea legării de celulele eucariote.

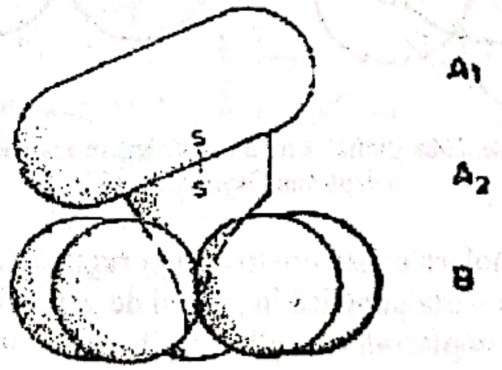



Fig. 22 – Modelul structural de tip AB al toxinei holerice (după Gill, 1976).

Toxina holerică este organizată structural în raportul A:B5. Subunitatea A, complexă, este sintetizată ca o catenă polipeptidică unică. Fragmentul A este clivat proteolitic într-un fragment N-terminal (A1) de 2 kDa cu activitate de ADP-ribozil-transferază şi un fragment C-terminal (A2) de 5 kDa.

*Subunitatea A1* (gr. mol. 2 kDa) reprezintă componenta biologic activă, purtătoare a funcţiei toxice, slab imunogenă. Are funcţia ADP-ribozilantă a unui component al sistemului adenilat ciclazei.

Scanned with OKEN Scanner

*Subunitatea A2* (gr. mol. 5 kDa) este legată de A1 printr-o legătură disulfidică (-S-S-). Poate fi separată cu solvenţi de disociere (detergenţi, guanidină hidroclorică 6M). Iniţial, s-a considerat că are rolul unic de stabilizare a complexului A. Apoi s-a demonstrat că A2 e necesară şi pentru translocaţia toxinei în celulă. Ea poartă o secvenţă „semnal", de proteină secretorie, implicată în transferul transmembranar.

*Subunitatea B* („Choleragenoid" sau „Toxoid H") are GM 56 kDa, este lipsită de activitate toxică şi reprezintă toxoidul natural. Prezintă în structura sa două secvenţe cu configuraţie α-helix şi 10 domenii β-pliate, iar aminoacizii implicaţi în legarea la GM1 sunt Arg-35 şi Trp-88. Determină activitatea antigenică a moleculei native şi inhibă competitiv legarea toxinei native de situsurile cu rol receptor. Este alcătuită din cinci subunităţi identice (gr. mol. 11,6 kDa). Modul de grupare a subunităţilor este puţin cunoscut. Are funcţie de legare a toxinei de membrana celulară. Pentamerul B5 este organizat într-o structură simetrică şi interacţionează necovalent cu A2. A2 are rolul de a lega fragmentul catalitic A1, de pentamerul B (fig. 23).

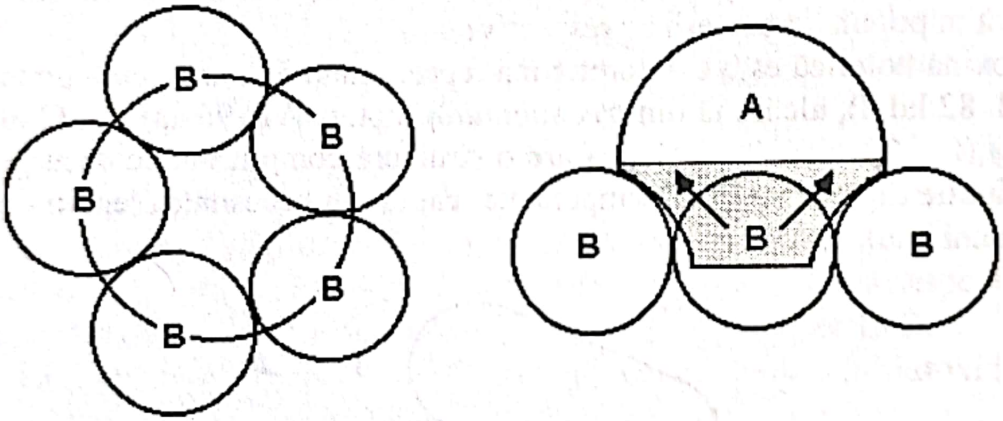



Fig. 23 – Reprezentarea grafică a modului de legare a subunităţilor de tip A şi B (după van Heyningen, 1977).

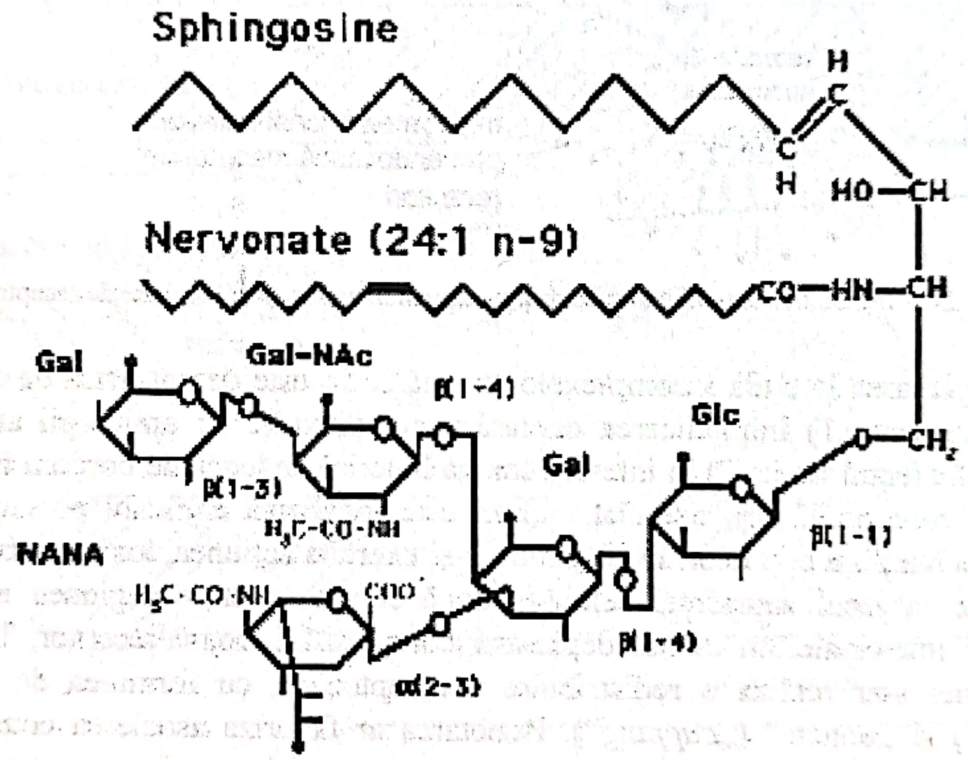
Sinteza toxinei holerice este controlată şi reglată de genele tox cromosomale (sau ctx), localizate pe harta genetică în grupul de gene his. Subunităţile A şi B ar fi sintetizate separat în citoplasmă pe polisomi liberi. Asamblarea lor într-o moleculă unică se face în spaţiul periplasmic, din care sunt eliberate foarte eficient în mediul înconjurător.

Toxina holerică, ca şi enterotoxina termolabilă de *Escherichia coli* se acumulează şi formează oligomeri în spaţiul periplasmic, înainte de a fi secretate pe o variantă a căii generale de secreţie. Oligomerizarea denotă că translocaţia prin membrană este fundamental diferită de translocaţia sec-dependentă prin membrana citoplasmatică.

Toxina holerică şi toxina termolabilă de *Escherichia coli* se leagă de receptorul $GM_1$ (un gangliozid) prin pentamerul B, cu fragmentul A1 catalitic orientat în afara membranei plasmatice. Translocaţia lui A1 se poate face direct

prin membrana plasmatică sau este mai întâi endocitat şi traversează membrana endosomului.

Gangliozidele sunt molecule lipidice complexe prezente în toate membranele plasmatice studiate. Ele au o regiune *hidrofilă*, încărcată electronegativ, care conţine resturi de D-galactoză, D-glucoză, N-acetil galactozamină şi acid N-acetil neuraminic, precum şi o regiune mai extinsă, *hidrofobă* – ceramida – care conţine acizi graşi cu lanţ lung asociaţi cu sfingozina. Una dintre cele mai cunoscute gangliozide este GM1 (galactozil-N-acetil-galactozaminil-sialozil-lactozil-ceramida), prezentă în cantitate mare şi în ţesutul cerebral. Datorită acestei particularităţi structurale, ceramida se poate insera în faza fluidă a membranei celulare, lasând porţiunea glucidică a moleculei pe faţa externă a membranei, pentru a reacţiona ca receptor pentru toxina holerică.




Gangliozidul $GM_1$

Numărul receptorilor gangliozidici de toxină holerică este variabil, în funcţie de natura celulelor. Numărul moleculelor de toxină holerică necesare pentru producerea unor modificări morfologice este de circa 10/celulă, iar pentru efectul toxic, aproximativ 50/celulă. Discrepanţa dintre numărul relativ mare de receptori şi concentraţia de toxină necesară pentru a produce efecte biologice evidente reflectă fie ineficienţa procesului de înglobare a toxinei, fie existenţa a două tipuri de receptori (eficienţi şi ineficienţi).

Mecanismul principal de înglobare a toxinei holerice în celule reprezentat de *endocitoza mediată de receptori*. Iniţial s-ar lega de gangliozide o singură subunitate B (fig. 24). Ulterior ar avea loc o difuzie laterală în planul membranei celulare, până când toate cele cinci subunităţi ale toxinei s-ar asocia cu cinci gangliozide.

Scanned with OKEN Scanner

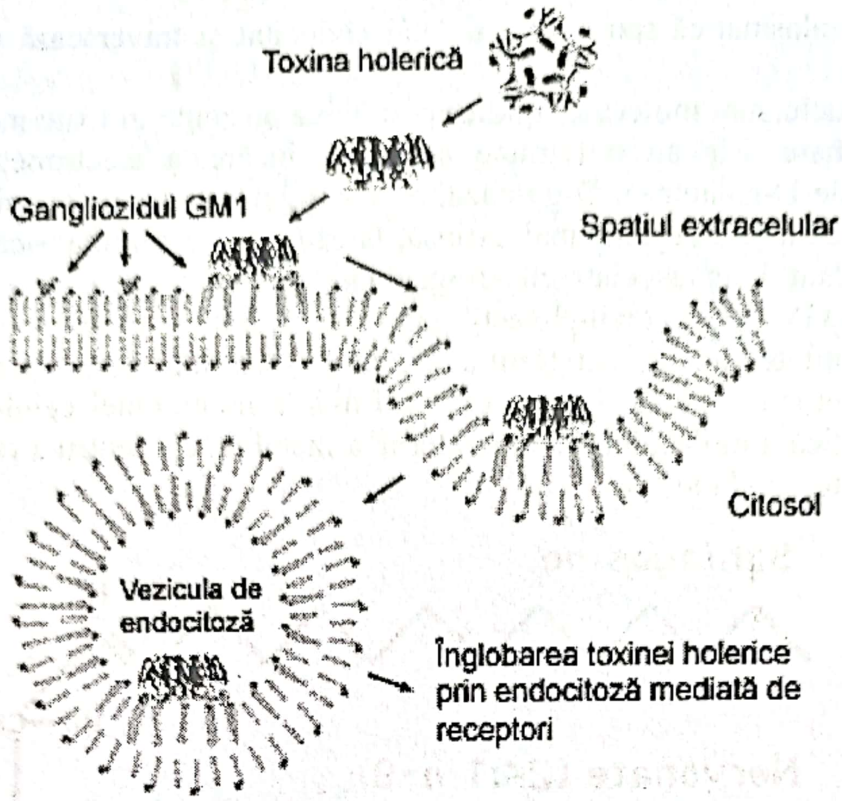



Fig. 24 – Înglobarea toxinei holerice prin mecanismul endocitozei mediate de receptori.

Deplasarea laterală a complexelor toxină/GM1 este demonstrată de cel puţin două fenomene: 1) împiedicarea deplasării complexului cu anticorpii antitoxină blochează efectul toxic; 2) în intestin, toxina holerică se leagă de bordura în perie a celulelor mucoasei. Ori, adenilat ciclaza este localizată exclusiv pe suprafeţele laterale şi bazală a celulelor. Deci, pentru a-şi exercita acţiunea, toxina trebuie să se deplaseze în jurul suprafeţei celulare, după ce s-a legat în regiunea apicală a celulelor intestinale. În cursul deplasării complexului toxină/receptor, în planul membranei s-ar realiza o redistribuire a receptorilor, cu formarea de „petice" („*patch*") şi „bonete" („*capping*"). Bonetarea ar favoriza asocierea complexului toxină/receptor cu o proteină membranară integrată, care ar favoriza translocaţia complexului în celulă.

Al doilea mecanism posibil de încorporare a toxinei holerice se bazează pe unele probe experimentale, care demonstrează apariţia unor alterări conformaţionale ale toxinei, după legarea la receptori. Legarea subunităţii B ar induce modificări de permeabilitate a membranei şi în plus „inelul" B s-ar deplia, favorizând formarea unui „canal" în structura acesteia.

Legarea toxinei holerice de celulele epiteliului intestinal este stimulată de neuraminidaza produsă de *Vibrio cholerae*, deoarece enzima catalizează desializarea gangliozidelor de ordin superior lui $GM_1$. Astfel se amplifică secreţia fluidului. *In vitro*, bordura în perie a intestinului subţire de iepure, expusă la neuraminidază leagă de 7 ori mai multă toxină cholerică marcată cu $I^{125}$, comparativ cu celulele netratate.

Deşi nu este considerată un factor major de virulenţă, neuraminidaza are un rol semnificativ în stimularea legării şi înglobării toxinei.

Subunitatea A, eliberată de constrângerile impuse de restul subunităţilor proteice cu care a fost asociată, poate interacţiona cu membrana lipidică, pentru a trece prin ea, deoarece este plasată exact lângă bistratul lipidic, într-o poziţie favorizantă pentru pătrunderea prin membrană.

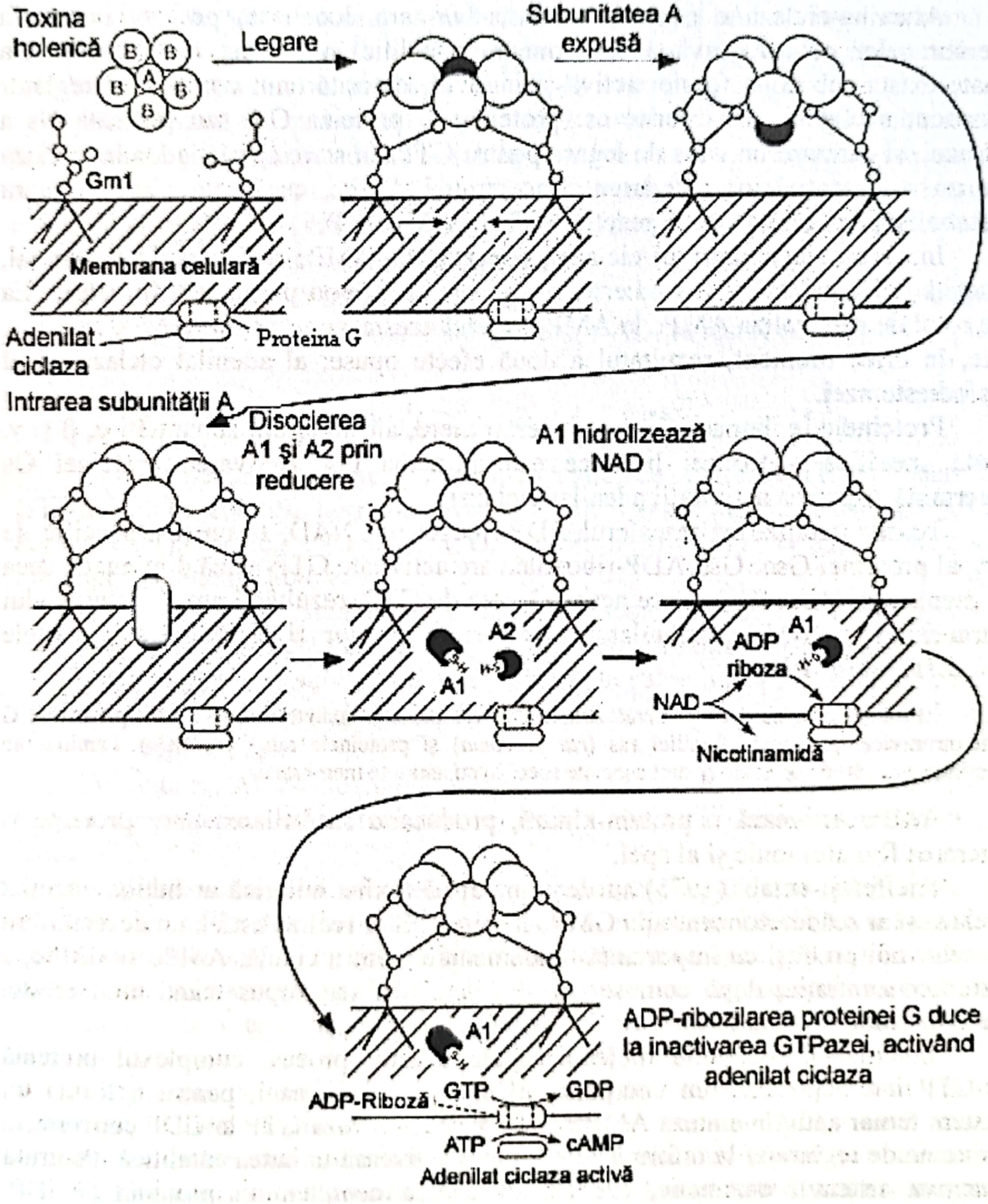



Fig. 25 – Reprezentarea schematică a mecanismului de pătrundere şi de acţiune al toxinei holerice.

Eliberarea segmentului activ A1 în celulă se face prin clivarea legăturilor S-S. Agentul reducător natural este glutationul, fapt care explică de ce legăturile S-S se menţin foarte rar în mediul intracelular.

Ţinta intracelulară a toxinei holerice este *adenilat-ciclaza*, unul dintre cele mai importante sisteme reglatoare ale celulei eucariote. Toxina holerică acţionează producând *ADP-ribozilarea* unui component reglator al sistemului adenilat ciclazei (fig. 25).

Adenilat-ciclaza e o enzimă multisubunitară, localizată pe faţa internă a membranelor celulare, având componentul catalitic în contact cu citosolul. Ea poate exista sub două forme: activă şi inactivă, datorită unui component reglator cunoscut sub denumiri diferite ca: proteina G, proteina G/F sau proteina Ns a ciclazei, şi care are un situs de legare pentru GTP. În stare activă, adenilat ciclaza are un rol esenţial în modularea concentraţiei AMPc, cu efecte directe asupra metabolismului celular, după reacţia: ATP ↔ AMPc + PPi.

În absenţa activatorului ciclazei, concentraţia AMPc revine rapid la normal, datorită enzimei AMPc-fosfodiesteraza, prezentă în mod permanent în celule. Ea are rolul de a hidroliza AMPc la AMP. În felul acesta, concentraţia AMPc în celule este, în orice moment, rezultatul a două efecte opuse: al adenilat ciclazei şi al fosfodiesterazei.

Proteinele reglatoare G* sunt heterotrimere, alcătuite din subunităţi α, β şi γ. Ţinta specifică a toxinei holerice este proteina Gs. Activarea proteinei Gs determină creşterea activităţii adenilat-ciclazei.

Toxina catalizează transferul ADP-ribozei din NAD, la un rest specific de Arg al proteinei Gsα. Gsα ADP-ribozilată are activitate GTP-azică diminuată, ceea ce menţine proteina G în stare activă, legată de GTP, rezultând creşterea nivelului intracelular de AMPc, stimulator al eliberării ionilor şi fluidului din celulele epiteliale intestinale.

* Proteinele G se presupune că sunt reglatoare ale căii secretorii. Ele includ proteinele G heterotrimerice, proteinele familiei ras (*rat sarcoma*) şi proteinele rab (*rat brain*). Familia rab cuprinde circa 30 de proteine şi sunt asociate specific cu anumite membrane.

AMPc activează o protein-kinază, producând fosforilarea unor proteine şi alterarea fluxului ionic şi al apei.

Kieffer şi colab. (1975) au demonstrat că toxina holerică ar inhiba guanilat ciclaza şi ar scădea concentraţia GMPc în celulă. S-ar realiza astfel, un dezechilibru al celor doi produşi cu importanţă fundamentală pentru celulă, AMPc şi GMPc, a căror concentraţie, după cum se ştie, oscilează în sens opus: când unul creşte, celălalt scade.

Sintetizând aspectele moleculare ale acestui proces, complexul proteină G/GTP interacţionează cu componentul catalitic al ciclazei, pentru a forma un sistem ternar activ în sinteza AMPc de la ATP. Hidroliza GTP la GDP converteşte proteina de reglare G la o formă care nu mai activează unitatea catalitică. Pentru a reactiva sistemul enzimatic, are loc disocierea complexului proteină G/GDP, urmată de legarea, din nou, a GTP de situsul originar.

Scanned with OKEN Scanner

Funcţional, ADP-ribozilarea proteinei de reglare G de către toxina holerică (subunitatea A1), converteşte această proteină la o stare incapabilă de a determina hidroliza GTP. Ori, inhibarea activităţii GTP-azice determină o activare persistentă a componentului catalitic al ciclazei. Rezultatul final este creşterea concentraţiei AMPc în celulă.

După legarea toxinei holerice de celulele intacte, *in vivo* şi *in vitro*, urmează o perioadă de lag de 15–60 de minute, înainte ca adenilat-ciclaza să fie activată. Timpul de lag este necesar translocaţiei peptidului A1 prin membrană şi contactului cu proteina G. Adenilat-ciclaza este localizată în membrana bazolaterală a celulelor polarizate ale epiteliului intestinal.

Mecanismul cel mai probabil prin care toxina holerică se leagă de bordura în perie apicală şi ajunge la adenilat-ciclaza bazolaterală este următorul: toxina intră în celule prin endocitoză, iar endosomul traversează celula cu peptidul A1 asociat membranei. pH-ul scăzut al veziculei de endocitoză favorizează translocaţia subunităţii A prin membrana endosomului.

Peptidul A1 catalizează ADP-ribozilarea proteinei Gsα din membrana bazolaterală, prin transferul ADP-ribozei de la NAD, la restul de Arg al Gsα, după reacţia:

$$NAD + Gs\alpha \longrightarrow (ADP\text{-}ribozil\text{-}Gs\alpha) + Nicotinamida + H^{+}.$$

Subunitatea α a proteinei Gs conţine un situs de legare a GTP şi are activitate GTP-azică. În condiţii normale, activarea adenilat-ciclazei continuă până când activitatea GTP-azică intrinsecă a Gsα hidrolizează GTP la GDP, inactivând proteina G şi adenilat-ciclaza.

Legarea GTP de subunitatea α duce la disocierea subunităţilor α, β şi γ ale proteinei Gs şi la creşterea afinităţii subunităţii α pentru adenilat-ciclază.

ADP-ribozilarea subunităţii α, catalizată de subunitatea A1 a toxinei, inhibă hidroliza GTP la GDP, lăsând adenilat-ciclaza activată constitutiv, probabil pentru tot restul vieţii celulei.

Activitatea ADP-ribozilantă a subunităţii A1 este stimulată *in vitro*, de o familie de proteine denumite factori ai ADP-ribozilării. Sunt proteine mici care leagă GTP.

Acţiunea toxinei holerice asupra ansei ileale de iepure este complet inhibată după adăugarea brefeldinei A, un metabolit fungic care interferă cu transportul veziculei endosomale şi cu calea transcitozei în multe categorii de celule eucariote. Pentru circuitul intracelular al toxinei cholerice este necesar aparatul Golgi intact.

Schimbarea este însoţită de acumularea fluidului apos în ansa ileală de iepure.

*Răspunsul celulei.* În mod normal, celulele mucoasei intestinale au un potenţial electric transmembranar spontan de valoare mică, care explică schimburile echilibrate, reprezentate prin permeabilitatea pasivă a mucoasei ce asigură fluxurile unidirecţionale de Na+ şi $Cl^{-}$ din lumen spre circulaţia sanguină. Ele sunt compensate de un flux moderat în direcţie opusă, cu deplasarea spre

Scanned with OKEN Scanner

lumen, în special a ionilor bicarbonat. Creşterea AMPc în celule are o serie de efecte negative, deoarece perturbă procesele normale de absorbţie/secreţie a ionilor şi apei prin epiteliul intestinal. Creşterea AMPc în celulă, datorată activării adenilat-ciclazei sub acţiunea toxinei holerice duce la creşterea secreţiei $Cl^-$ în celulele criptelor intestinale şi scăderea absorbţiei NaCl de către celulele microvililor. Se produce o deplasare netă a electroliţilor în lumen, datorită unui gradient osmotic transepitelial care determină trecerea apei în lumen. Volumul masiv de apă depăşeşte capacitatea absorbtivă a intestinului. Aceasta explică particularitatea clinică majoră de enterită acută, cu pierdere masivă de lichide, deshidratare gravă şi şoc consecutiv.

În realizarea acestui dezechilibru pot interveni, aşadar, mai multe mecanisme care pot fi sintetizate în următoarele categorii:

– activarea enzimelor fosforilante de tipul proteinkinazelor, cu acţiune directă asupra transportului ionilor;
– creşterea tranzitorie a potenţialului electric membranar;
– eliberarea $Ca^{2+}$ din depozitele celulare şi acţiunea acestora asupra purtătorilor de ioni, pe calea proteinkinazelor.

Toxina holerică este unul din cei mai potenţi imunogeni. Administrarea toxinei stimulează un răspuns imun viguros nu numai faţă de toxină, dar şi faţă de antigenele administrate simultan pe cale orală.

*Toxinele accesorii.* Până de curând s-a considerat că manifestările clinice ale holerei rezultă în primul rând din interacţiunea toxinei holerice cu celulele epiteliale intestinale. Apariţia diareii medii până la moderată, la voluntarii umani cărora li s-au administrat oral tulpinile de vaccin sau mutante modificate genetic, care nu produc toxina holerică activă, a stimulat identificarea altor toxine care pot contribui la patogeneza holerei. Astfel s-a descoperit o nouă toxină holerică (care se deosebeşte prin secvenţa aminoacizilor şi prin proprietăţile antigenice de toxina holerică cunoscută), toxina zonei occludens, enterotoxina holerică accesorie şi enterotoxinele termostabile. Rolul lor în patogeneza *Vibrio cholerae* nu este pe deplin elucidat. Ele nu pot produce cholera gravis, dar pot stimula manifestările patologice produse de toxina cholerică. În absenţa toxinei holerice, pot stimula mecanisme secretogene secundare.

*Vibrio cholerae* are un nivel înalt de variabilitate genetică, datorită transferului genelor pe orizontală, ceea ce explică diversitatea toxinelor pe care le sintetizează tulpinile patogene care circulă în mediul natural.

Toxina *zot* (*z*onula *o*ccludens *t*oxin) produce creşterea permeabilităţii mucoasei intestinului subţire, datorită efectelor sale asupra structurii joncţiunilor intercelulare strânse (zona occludens). Examenul electrono-optic al joncţiunilor strânse dintre celulele epiteliale ileale expuse toxinei holerice relevă „relaxarea" joncţiunilor, astfel încât devin permeabile pentru un marker electronodens. Genele care codifică sinteza toxinei zot sunt localizate în „caseta de virulenţă", înaintea genelor ctx.

Scanned with OKEN Scanner

Deoarece genele *zot* şi *ctx* acoperă 55% din secvenţa de 4,5 kb denumită „caseta de virulenţă", s-a investigat rolul potenţial al porţiunii de 45% care rămâne din această regiune genomică în patogeneza vibrionului holeric. Ca urmare, o a treia toxină holerică, toxina holerică accesorie (ACE), a fost identificată de Trucksis şi colab. (1993).

*Hemolizina/citolizina* El Tor sau citolizina holerică produsă de *Vibrio cholerae* O şi nonO1 este activă faţă de o varietate de eritrocite şi de celule mamaliene *in vitro*. Hemolizina este secretată în formă proactivă de 79 kDa, iar forma cu activitate enzimatică rezultă după clivare proteolitică, fiind reprezentată de un polipeptid de 69 kDa, hidrosolubil. Este o toxină formatoare de pori selectivi pentru anioni cu specificitate pentru colesterol şi ceramide (sfingolipide). Hemolizina purificată produce acumularea fluidului în ansa ileală de iepure, dar spre deosebire de fluidul apos indus de toxina cholerică, fluidul acumulat conţine totdeauna hematii.

### *Toxinele produse de speciile de Aeromonas*

Pe lângă enzimele care favorizează infecţia (proteaze, elastaze, DN-aze, fosfolipaze, lipaze), speciile de *Aeromonas* produc diverse toxine: enterotoxine, citotoxine, hemolizine, aerolizine.

*β-hemolizina*, numită şi enterotoxina citotoxică, aerolizina sau ASAO-hemolizina termolabilă, este principalul factor de virulenţă implicat în boala diareică şi prezintă activitate fosfolipazică A şi C. Are efect citolitic, fomează pori în membrana celulară şi provoacă acumularea lichidului în ansa ileală izolată. Această citotoxină pare a fi un factor de virulenţă foarte important deoarece tulpinile mutante de *Aeromonas hydrophila* (cu deleţii în gena aerolizinei) sunt de 50 de ori mai puţin virulente decât tipul salbatic. Aerolizina nu este înrudită cu alte citolizine, cu excepţia unei secvenţe de 10 aminoacizi care se aseamănă cu o regiune a α-toxinei de *Staphylococcus aureus*. Semnificaţia acestei secvenţe este necunoscută; de asemenea toxinele au capacitatea de a forma oligomeri insolubili de sodium- dodecil sulfat (SDS) care au activitate de permeabilizare a canalelor pentru ioni in membranele artificiale bistratificate.

Din punct de vedere biochimic, citotoxicitatea *aerolizinei* este foarte bine studiată: preprotoxina (53,8 kDa) este prelucrată proteolitic în 2 etape şi eliberează toxina matură (50 kDa). Prima etapă în acest proces constă în clivarea proteolitică a secvenţei semnal (secvenţa N-terminală), urmată de exportul protoxinei în periplasmă. Aerolizina se acumulează în periplasma celulelor de *Aeromonas*, dar intermediarii oligomeri nu se găsesc decât pentru intervale scurte. Protoxina este inactivă şi devine citolitică numai după clivarea unei secvenţe de 20–30 aminoacizi de la capătul C-terminal. Clivarea protoxinei de către proteazele bacteriei sau chiar ale gazdei are loc, de obicei, după secreţia în mediu.

Scanned with OKEN Scanner

Aerolizina matură se leagă la receptorii de pe membrana eritrocitelor şi a limfocitelor T prin receptori de înaltă afinitate, care sunt glicoproteine cu ancore glicozil-fosfatidil-inozitol (GPI). Forma legată a aerolizinei oligomerizează şi formează un complex citolitic activ care produce un por cu diametrul de 3 nm. Aerolizina, dar nu şi proaerolizina, formează canale ionice în membranele artificiale bistratificate. Ionii de Zn inhibă agregarea şi inactivează canalele. Contrar faţă de hemolizina de la *Escherichia coli*, canalele formate de aerolizină sunt selective, permiţând preponderent trecerea anionilor.

Substituţia resturilor de His din poziţiile 107 şi 132 previne agregarea monomerilor de aerolizină într-un oligomer activ, iar substituţia His din poziţia 332 scade afinitatea toxinei pentru receptorii de pe eritrocite.

O enigmă în ceea ce priveşte structura şi funcţia aerolizinei este aceea că în structura primară nu există secvenţe de aminoacizi hidrofobi suficient de lungi pentru a forma o structură transmembranară α-helix clasică, ceea ce ar fi de aşteptat în cazul unei toxine care se leagă de membrană. Aceasta ar putea oferi răspunsul cu privire la structura aerolizinei, deoarece domeniile porinelor transmembranare au o structură β-pliată.

S-a demonstrat că există un mare grad de asemănare între canalele ionice formate de aerolizină şi porinele membranei externe bacteriene. Toxina se leagă la receptorii specifici membranari şi induce formarea porilor printr-un mecanism foarte complex. S-a demonstrat că proaerolizina are activitate chimiotactică, inducând eliberarea $Ca^{2+}$ din depozitele intracelulare prin intermediul activării proteinei G sensibile la aerolizină.

Proaerolizina determină depolarizarea canalelor de $K^+$. Se pare că toxina matură se oligomerizează, formând un complex heptameric şi determină apariţia porilor care modifică gradientele de $K^+$ şi $Na^+$, potenţialul de membrană şi nivelul citosolic al ionilor de $Ca^{2+}$.

Gena *aerA* care codifică această β-hemolizină este prezentă la toate speciile de *Aeromonas*, izolate în clinică sau din mediu. Diferitele activităţi (hemolitică, citotoxică, enterotoxică) par a fi codificate de loci diferiţi.

Recent s-a reuşit producerea unei proteine „aerolizin-*like*" (proteina Act de 52 kDa) recombinată, codificată de o genă *act*, hiperprodusă la *Escherichia coli* al cărei studiu a permis punerea în evidenţă a receptorului membranar al acestei toxine, *colesterolul*. Proteina *Act* posedă activităţi hemolitice, citotoxice şi enterotoxice. Tot la *Aeromonas hydrophila* au mai fost descoperite încă două enterotoxine: o *enterotoxină citotonică termolabilă* (Alt) şi o *enterotoxină citotonică termostabilă* (Ast) – neînrudite cu toxina holerică (CTX). S-a studiat distribuţia genelor *alt, ast* şi *act* la 115 din 125 aeromonade izolate de la copii cu diaree. Pentru comparaţie s-au ales la întâmplare 120 aeromonade izolate din diferite componente de la suprafaţa apei în Bangladesh. Tulpinile de *Aeromonas* pozitive numai pentru gena *alt* au distribuţie similară la nivelul surselor; numărul tulpinilor pozitive numai pentru gena *ast* este semnificativ mai mare pentru probele din mediu; izolatele pozitive numai

Scanned with OKEN Scanner

pentru gena *act* nu au fost detectate în nici una dintre surse. Important este că numărul tulpinilor dublu pozitive pentru gena *alt* şi pentru gena *ast* este semnificativ mai mare în probele izolate din scaunul diareic, ceea ce sugerează că produşii celor două gene pot acţiona sinergic, inducând diaree severă.

La tulpini de *Aeromonas hydrophila* şi *Aeromonas salmonicida* a fost evidenţiată o hemolizină cu activitate redusă, un glicerofosfolipid: colesterol aciltransferaza (GCAT).

Citotoxinele, pentru care au fost descrişi cel puţin 4 factori (de exemplu, citotoxina termolabilă -Alt, citotoxina termostabilă -Ast şi citotoxina -Act), dintre care câţiva neutralizabili de către serul anti-toxină holerică, induc elongarea celulelor CHO, rotunjirea celulelor Y1 şi creşterea nivelului intracelular de AMPc. Rolul lor în patogeneza speciilor de *Aeromonas* este controversat.

*Alt* este o enterotoxină inactivată la $56^0$C, reprezentată de un monomer peptidic de 44 kDa, care spre deosebire de *Act A*, nu prezintă omologie cu toxina holerică. Stimulează acumularea de AMPc şi creşterea nivelului de prostaglandine în celulele CHO şi celulele epiteliale intestinale şi determină acumularea lichidului în ansa ligaturată de iepure. Spre deosebire de Alt, Ast este o enterotoxină stabilă la $56^0$C. Act este o enterotoxină citotoxică cu proprietăţi hemolitice care se prezintă sub forma unui lanţ polipeptidic unic de 52 kDa. Determină acumularea lichidului în ansa ileală ligaturată de iepure şi leziuni tisulare.

Speciile de *Aeromonas* produc 2 tipuri de siderofori fenolici: *amonabactina* şi *enterobactina.* Amonabactina, proprie speciilor mobile de *Aeromonas* este exprimată în principal de speciile de *Aeromonas hydrophila*; este capabilă să capteze Fe din transferina plasmatică. Din contră, enterobactina exprimată mai ales de *Aeromonas veronii* biogrup *sobria* este comună pentru numeroase enterobacterii: este inactivată de albumina serică. Speciile de *Aeromonas* utilizează un sistem de chelatare a Fe independent de siderofori.

## Endotoxine

Termenul de „endotoxină" (introdus de Pffeifer, 1892) este impropriu, deoarece lipopolizaharidele (LPS) sunt componente ale suprafeţei bacteriilor Gram negative, dar este totuşi folosit pentru că, spre deosebire de exotoxine semnifică asocierea LPS cu celula.

Factorul toxic al bacteriilor Gram negative a fost extras de Boivin şi Mesrobeanu (1933). Ei au identificat complexul glico-lipidic, cu antigenul somatic (O) al bacteriilor ce formează colonii netede (*S-S*mooth).

Endotoxinele LPS sunt componente structurale ale peretelui celular, la toate bacteriile Gram negative patogene şi se eliberează după dezintegrarea celulei. Sunt relativ termo-stabile şi mai puţin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate. Din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt

Scanned with OKEN Scanner

macromolecule complexe ce conţin fosfolipide şi polizaharide. Toxicitatea lor rezidă în fracţia fosfolipidică. Nu se denaturează şi nu rezultă anatoxine.

Endotoxinele LPS reprezintă 25% din moleculele de suprafaţă ale celului şi sunt esenţiale pentru integritatea membranei externe.

### *Structura chimică a moleculei de LPS*

Molecula de LPS este alcătuită dintr-un complex poliozidic şi o parte lipidică (fig. 26). De aici derivă proprietăţile *amfipatice* ale acestui agregat molecular, conferit de grupări polare hidrofile şi grupări apolare hidrofobe.

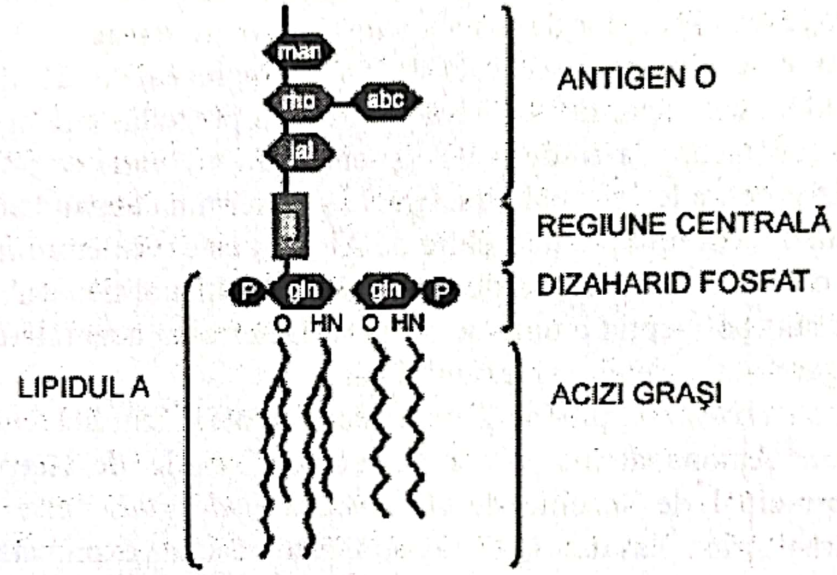



Fig. 26 – Structura lipidului A (după Fox, 2003).

La microscopul electronic, filamentele LPS au o structura trilaminară, corespunzătoare celor două straturi poliozidice şi stratului lipidic.

Cele mai studiate LPS sunt cele produse se tulpinile de *Salmonella*. Din punct de vedere chimic, molecula LPS, după extracţia cu amestecul fenol-apă, cuprinde trei regiuni distincte:

- regiunea polizaharidică externă, ce conferă specificitate serologică moleculei de endotoxină;
- regiunea centrală, reprezentată de oligozaharidul R;
- regiunea internă hidrofobă – lipidul A, prin care molecula LPS se ancorează în membrana externă.

Componenta lipidică conferă moleculei LPS, calitatea de toxină.

Oligozaharidul regiunii R şi lipidul A sunt relativ invariabile şi au constituienţi similari la diferite specii de bacterii Gram negative.

*Polizaharidul regiunii externe* este un polimer de unităţi oligozaharidice repetitive şi conferă specificitate serologică de grup, diferitelor variante antigenice de *Salmonella*. Unităţile oligozaharidice conţin 2–4 componente monozaharidice:

Scanned with OKEN Scanner

D-manoza, D-galactoza, L-ramnoza, o dezoxihexoză, o didezoxihexoză. Didezoxihezozele sunt zaharuri care nu există în stare liberă în natură, dar intră frecvent în structura polizaharidului enterobacteriilor şi au primit denumiri care derivă de la speciile de origine: abequoza, tiveloza, paratoza, colitoza.

Variaţia antigenică a polizaharidului regiunii externe se amplifică pe următoarele căi:

- schimbări ale poziţiei legăturilor (de exemplu, 1–4 în loc de 1–6);
- configuraţii moleculare modificate;
- înlocuiri la nivelul diferitelor subunităţi repetitive;
- deleţia sau substituţia unui rest glucidic din subunităţile oligozaharidice.

*Regiunea centrală* a LPS („miezul" R) are o variabilitate chimică mult mai restrânsă şi conferă specificitatea de gen. Oligozaharidul este legat de lipidul A printr-un trizaharid, 2-ceto-3-dezoxioctonat (KDO).

*Lipidul A* este legat covalent de oligozaharidul regiunii centrale R. La *Salmonella*, lipidul A este alcătuit din dizaharide de D-glucozamină legate beta 1-6, interconectatè la rândul lor prin punţi pirofosforice. Grupările –OH şi $–NH_2$ ale glucozaminei sunt substituite de acizi graşi (lauric, palmitic, miristic).

Tulpinile care formează colonii R sintetizează o endotoxină incompletă, căreia îi lipseşte polizaharidul regiunii externe, iar regiunea centrală are un conţinut scăzut de glucide.

Structura LPS variază mult la diferite specii bacteriene, în ceea ce priveşte fosfatul şi acilarea cu acizi graşi a lipidului A, fapt care explică răspunsul diferit al celulelor *in vivo* şi *in vitro*. *In vivo*, analogii lipidului A căruia îi lipsesc unul sau mai mulţi acizi graşi sau fosfaţi au efecte pirogene reduse, iar reacţia Shwartzman, testul de bază al toxicităţii LPS *in vivo*, este absentă.

*Porphyromonas gingivalis, Helicobacter pylori* şi *Chlamydia trachomatis*, asociate cu maladii inflamatorii cronice, conţin LPS cu activitate biologică scăzută, adică stimulează puţin sinteza de mediatori ai inflamaţiei. Aceste LPS au mai puţini acizi graşi şi grupări fosfat ataşate de lipidul A.

### *Efectele endotoxinelor LPS*

Termenii de „LPS" şi „endotoxină" sunt folosiţi cu sensuri echivalente, dar LPS semnifică moleculele purificate, iar denumirea de „endotoxină" desemnează complexul format din LPS şi proteinele asociate din membrana externă.

Efectele biologice ale endotoxinelor asupra gazdei sunt diverse, începând cu manifestările timpurii (stare febrilă şi hipoglicemie*), până la efectele tardive şi complexe (necroză tisulară, sfârşit letal). Endotoxinele activează multe căi efectoare, care includ cascada complementului şi cea de coagulare, precum şi pe cele care induc modificări ale activităţii diferitelor sisteme celulare.

* Pierderea rezervelor glucidice din ficat se poate datora degradării cu o rată crescută, represiei sintezei sau poate avea ambele cauze. Legarea endotoxinei de ţesutul hepatic şi de alte celule este cel

Scanned with OKEN Scanner

mai timpuriu eveniment în răspunsul gazdei la LPS. După injectarea endotoxinei, rezervele de amine biogene, histamină, serotonină şi peptidele ca bradikinina sunt eliberate în câteva minute şi mediază modificările timpurii. Plachetele scad numeric imediat după administrare.

Acţiunea majoră a endotoxinelor *in vivo* şi *in vitro* constă în inducerea sintezei unei varietăţi de factori solubili cu activitate biologică (mediatori): factorul pirogen endogen (IL-1), interferon, CSF (*c*olony *s*timulating *f*actor) etc. Unii dintre mediatori pot fi produşi de limfocite, fibroblaste sau de celulele endoteliale, dar toţi sunt produşi de macrofagele* stimulate de endotoxine. Interacţiunea endotoxinelor cu macrofagele poate fi evenimentul primar al iniţierii tuturor efectelor biologice ale endotoxinelor.

* Macrofagul se activează sub acţiunea mai multor factori (complexe Ag-Ac, IFN), dar cel mai puternic activator este endotoxina.

Activarea constă în amplificarea ratei metabolice şi macrofagul devine *killer* potenţial al celulelor tumorale. Macrofagul activat nu interacţionează cu antigenele tumorale specifice, dar ca şi celulele NK, pare să distingă între celulele maligne şi cele normale, prin mecanisme moleculare necunoscute.

Macrofagele activate secretă diferite molecule antitumorale:

– enzime hidrolitice care degradează ţesutul conjunctiv;

– IFN-α, activator al celulelor NK şi al macrofagelor;

– secretă IL-1, cu effect stimulator asupra celulelor B, T si K. IL-1 produce efectul febril in reacţia inflamatorie;

– TNF-α (caşectina) poate omorî celulele tumorale prin efecte toxice directe şi indirect prin efecte asupra vascularizaţiei tumorii. Toxicitatea directă este mediată prin legarea TNF de receptorii celulelor tumorale, ce activează o cale de semnalizare ce produce apoptoza. Efectul toxic indirect se datorează inducerii trombozei vaselor sanguine urmată de necroza tumorii. TNF are efect stimulator asupra altor celule care eliberează IL;

– $H_2O_2$ şi produşi de oxidare a glucozei, cu efect toxic direct asupra celulei ţintă, prin perturbări membranare

– oxidul nitric (NO), toxic pentru celulele maligne. NO se formează prin combinarea oxigenului cu azotul derivat din dezaminarea enzimatică oxidativă a L-argininei.

Reacţia este catalizată de nitric-oxid-sintază. NO mediază citotoxicitatea macrofagului, dependentă de L-arginină.

Arginina este un aminoacid dibazic şi este sintetizată în cantităţi adecvate pentru menţinerea echilibrului azotat. Necesarul dietetic asigură creşterea optimă a organismelor tinere, la unele specii. În anumite situaţii, ca de exemplu, la organismele imature sau în condiţiile stresului sever produs de septicemii, traume sau de excesul de compuşi azotaţi, Arg devine indispensabilă pentru menţinerea echilibrului azotului. Arginina are câteva proprietăţi farmacologice, inclusiv o marcată funcţie imunomodulatoare. Administrarea suplimentară, enterică sau parenterală, a Arg (500 mg/kg/zi) la rozătoare, stimulează dezvoltarea timusului, creşte numărul şi mitogeneza limfocitelor. Arginina favorizează răspunsul antitumoral faţă de o varietate de tumori (transplantate, induse chimic sau virale), reducând rata creşterii, diseminarea metastatică şi creşterea perioadei de latenţă a dezvoltării tumorii. Macrofagele citotoxice generează NO şi distrug celula ţintă prin inhibiţia aconitazei (enzimă a ciclului Krebs), a respiraţiei mitocondriale şi a sintezei ADN.

Endotoxina este aproape unică printre toxinele microbiene, datorită capacităţii de a induce o largă varietate de răspunsuri biologice: febră, inflamaţie şi starea de şoc. LPS modifică intensitatea răspunsului imun (au activitate imunomodulatoare*).

Scanned with OKEN Scanner

* Imunomodulatorii sunt compuşi chimici biologici sau nebiologici care interacţionează cu sistemul imunitar şi modifică stimulator sau inhibitor (represor) răspunsul celulelor imunitare competente prin mecanisme de semnalizare. Celulele sistemului imunitar recunosc imunomodulatorii şi îşi modifică reactivitatea faţă de antigene.

*LPS* sunt molecule *toxice* şi dozele mari produc efecte patologice ample: hipertermie, leucopenie, modificări cardiovasculare şi metabolice.

*Dozele mici* de LPS stimulează funcţia macrofagelor, în primul rând sinteza IL-1 şi a IFN.

Rolul imunostimulator al LPS s-a remarcat odată cu observaţia că titrul Ac serici faţă de anatoxinele difterică şi tetanică creşte de câteva ori dacă sunt asociate cu celule omorâte de *Bordetella pertusis* sau cu alte celule Gram negative.

*Efectul adjuvant*

Efectele LPS asupra *sistemului imunitar* sunt multiple şi profunde. Mamiferele şi probabil şi alţi reprezentanţi ai regnului au elaborat sisteme de detectare şi amplificare a răspunsului la infecţia cu bacterii Gram negative, dar este un răspuns la LPS. Cea mai mare parte a efectului adjuvant se datorează lipidului A. Multe categorii de celule recunosc cantităţi mai mici de 1 ng de LPS şi răspund prin producerea aproape imediată a *citokinelor*, *chemochinelor* şi a moleculelor de aderenţă celulară. Toate acestea formează o parte a sistemului de apărare înăscută care se mobilizează în răspunsul inflamator pentru eliminarea infecţiei bacteriene. În condiţiile unei infecţii masive cu bacterii Gram negative, LPS stimulează sinteza citokinelor în exces şi efectele pot fi fatale.

*In vivo* LPS stimulează IMC şi IMH, dar toxicitatea preparatelor le-a făcut inutilizabile ca vaccin uman. Efectul adjuvant, ca şi proprietatea endotoxică rezidă în componenta lipidică.

LPS măresc rezistenţa la infecţia virală, probabil datorită inducerii sintezei interferonului şi au efecte mitogene faţă de celulele B *in vitro*. Răspunsul imun presupune interacţiuni complexe între macrofage, limfocitele T şi B şi probabil acţiunea adjuvantă a LPS se exercită prin influenţe asupra tuturor acestor tipuri de celule.

Proliferarea limfocitelor B *in vitro* s-a măsurat prin încorporarea timidinei tritiate ($H^3$-TdR) în acidul nucleic. Populaţia de limfocite B s-a obţinut din splina de şoarece, prin liza celorlalte tipuri de celule cu ser imun anti-RCT şi complement. Deoarece proliferarea clonală a limfocitelor B este baza sintezei anticorpilor, orice agent capabil să producă proliferarea celulelor B este un adjuvant şi invers, proliferarea este esenţa proprietăţii de adjuvant. Efectul mitogen este mediat de componenta lipidică, obţinută prin hidroliza acidă a LPS.

Limfocitele activate de antigene sau mitogene eliberează o varietate de limfochine, cu efecte biologice diferite, toate având acţiune asupra liniei monocitare: MIF (factorul inhibitor al migrării macrofagelor), MAF (factorul activator al macrofagelor), factorul chimiotactic al monocitelor.

Scanned with OKEN Scanner

Una dintre căile de acţiune a adjuvanţilor este mediată de macrofage. Macrofagul poate fi activat direct de LPS, dar şi indirect pe calea limfochinelor eliberate din limfocitele B.

*In vivo*, cantitatea de LPS este prea mică pentru a induce un efect mitogen direct. LPS ar produce o activare parţială a limfocitelor B, astfel ca în prezenţa unui antigen să se producă proliferarea limfocitelor B. Răspunsul ar avea specificitate de antigen, deoarece ar fi stimulate să se dividă numai celulele B cu receptori pentru antigenul imunizant.

După ce s-a determinat structura lipidelor unor enterobacterii (*Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Salmonella minnesota, Proteus mirabilis*) s-au sintetizat molecule omologe *LPS* de *Escherichia coli* şi *Salmonella minnesota.* Sinteza a permis modificări multiple ale arhitecturii componentelor lipidului A. Efectul adjuvant al lipidului A ori al LPS s-a amplificat, prin introducerea unor structuri noi în molecula sintetică. S-a urmărit diminuarea efectelor toxice, astfel încât este posibilă administrarea lor la om.

LPS nativă, toxică, stimulează atât *in vivo* cât şi *in vitro*, toate cele 3 categorii de celule care participă la elaborarea RI: macrofage, celule T şi B. Efectul stimulator al LPS este mediat de citochinele eliberate de celulele stimulate de LPS. Citochinele influenţează mai multe tipuri celulare.

Lipidele A sintetice asemănătoare cu LPS de *Escherichia coli*, codificată 506, ori LA-15-PP şi respectiv cu cea de *Salmonella minnesota* codificată 516, ori LA-16-PP au proprietăţi adjuvante foarte bune.

*Monofosforil-lipidul A* (MPL), un derivat sintetic al lipidului A, a stimulat creşterea de 16 ori a titrului de Ac anti-ovalbumină, detectaţi prin metoda ELISA şi a întrerupt starea de toleranţă indusă de dozele mici de polizaharid de pneumococ, mediată de celulele Ts.

Efectele imunomodulatoare ale LPS sunt mediate de citochinele sintetizate de macrofagele stimulate: IL-1 şi TNF-alfa.

*Răspunsul imun anti-LPS*

LPS sunt molecule foarte *imunogene*. Anticorpii au specificitate faţă de polizaharidul extern şi precipită LPS, dar nu neutralizează efectele lor toxice. Răspunsul imun este de tip primar, cu sinteza prelungită de IgM, un titru minim de IgG şi se activează chiar în absenţa limfocitelor T, deoarece molecula de LPS este un antigen timo-independent, cu grupări antigenice repetitive.

Endotoxinele sintetizate de variantele coloniale „rugoase" sunt mai puţin imunogene, datorită structurii lor mai simple.

Lipidul A are proprietăţi imunogene, iar anticorpii specifici reacţionează încrucişat cu lipidul A al altor endotoxine, datorită uniformităţii structurii sale.

Antigenul polizaharidic, obţinut prin hidroliza acidă îşi păstrează proprietatea de specificitate, dar nu este imunogen, având proprietatea de haptenă.

*Recunoaşterea moleculelor LPS.* LPS sunt molecule amfifile, cu o parte hidrofobă, capabilă să se dizolve în lipidele membranare şi o parte hidrofilă, care

Scanned with OKEN Scanner

poate rămâne în faza apoasă. O primă treaptă a acţiunii LPS o constituie *interacţiunea directă* între molecula amfifilă şi suprafaţa celulei sensibile. Molecula LPS poate fi inserată în membrana celulei prin jumătatea hidrofobă sau se ataşează de receptorii membranari prin jumătatea hidrofilă.

O modalitate distinctă a interacţiunii LPS cu macrofagele este aceea *mediată* de o proteină plasmatică de fază acută denumită LBP (*LPS binding protein*).

LPS se leagă iniţial cu LBP plasmatică şi se formează un complex care transferă catalitic LPS, moleculei $CD_{14}$. LBP este o moleculă de transfer al lipidelor, care catalizează transferul fosfolipidelor, în special al monomerilor LPS din agregatele de LPS, la lipoproteine sau la $CD_{14}$. LPS eliberat din celulele Gram negative se găseşte ca agregate, datorită naturii amfifile a moleculei. Din agregate, LPS este transformat în monomeri sub acţiunea LBP. Consecinţa este inactivarea LPS prin transferul la lipoproteine (HDL) sau activarea răspunsului imun prin transferul LPS la $CD_{14}$ membranar al celulelor mielomonocitare sau la $CD_{14}$ solubilă. Rata celor două procese determină tipul de răspuns al gazdei: de inactivare a LPS sau de activare a răspunsului imun.

$CD_{14}$ şi LBP, după ce leagă LPS administrat în doze letale, au rol toxic în modelele de endotoxemie experimentală la şoarece. Blocarea LBP cu anticorpi specifici şi şoarecii dublu mutanţi (*knockout*) pentru $CD_{14}$ a prevenit şocul LPS. LPS este transferată preferenţial la $CD_{14}$ şi nu la HDL.

$CD_{14}$ este o proteină membranară (53 kDa) legată printr-o ancoră de glicozil-fosfatidil-inozitol (GPI) pe suprafaţa celulelor mieloide, monocitare şi endoteliale. $CD_{14}$m (membranar) recunoaşte LPS eliberat de LBP.

LPS se poate complexa şi cu forma serică solubilă de $CD_{14}$ ($CD_{14}$s). Complexul solubil activează celulele nemieloide (monocit/macrofag, endoteliale) sau transferă LPS la HDL, rezultatul fiind neutralizarea LPS. $CD_{14}$ solubil leagă LPS, într-un proces catalizat de LBP. Complexul $CD_{14}$s-LPS se leagă pe receptori necunoscuţi ai celulelor $CD_{14}^-$ (epiteliale, endoteliale) şi le activează

Rolul proteinei $CD_{14}$, probabil este acela de a concentra liganzii de origine microbiană la suprafaţa celulei. Recunoaşterea specifică a epitopilor LPS are loc după legarea cu $CD_{14}$.

Pe suprafaţa monocitului s-au identificat şi alte molecule ($CD_{18}$) care recunosc LPS. Rolul lor este probabil acela de a internaliza LPS, rezultatul fiind detoxifierea. $CD_{18}$ activează limfocitele numai la niveluri înalte, nefiziologice de LPS.

$CD_{14}$ poate să funcţioneze ca receptor nu numai pentru LPS, ci şi pentru *peptidoglican*. Peptidoglicanul este componentul major al peretelui bacterian Gram pozitiv. Este practic insolubil şi foarte heterogen în ceea ce priveşte compoziţia chimică şi masa moleculară. Nu se cunoaşte care este dimensiunea limită a complexului stimulator al reactivităţii celulare. Pentru a stimula celulele, peptidoglicanul, structură complexă cu greutate moleculară mare, trebuie să fie prelucrat. Se acceptă că există două căi de prezentare a fragmentelor imunogene:

1) scindarea în macrofagul care expune fragmentele imunogene în asociaţie cu moleculele CMH II;

Scanned with OKEN Scanner

2) clivarea catalizată de factori plasmatici, care produc fragmente mici prezentate în asociaţie cu moleculele $CD_{14}$ stimulatoare ale limfocitelor T.

Sursele majore de endotoxine sunt următoarele:

1) septicemia cu bacterii Gram negative;
2) translocaţia bacterilor originare în microbiota intestinală, datorită leziunilor mucoasei.

O particularitate a LPS, în contrast cu acţiunea exotoxinelor, constă în aceea că simptomele toxice nu se datorează acţiunii lor directe asupra celulelor sensibile, ci sunt mediate, în mare parte, de citokinele sintetizate *de novo* de macrofage, ca răspuns la LPS.

Efectele endotoxinei se manifestă atât în stare fizică legată de celulă, cât şi după ce a fost eliberată. Endotoxinele se eliberează prin moartea şi liza celulei sau printr-un proces de „înmugurire", care nu afectează viabilitatea acesteia. Din această cauză, cele două stări, *endotoxemia* şi *bacteriemia* pot să coexiste sau să se manifeste în etape distincte ale procesului infecţios. Proprietăţile endotoxice ale celulelor bacteriene, vii sau omorâte sunt aceleaşi cu ale preparatului de endotoxină. În organismul infectat nu este o corelaţie lineară între nivelul bacteriemiei şi endotoxemiei şi respectiv, intensitatea efectelor endotoxice. Capacitatea organismului de a detoxifica este un factor modulator esenţial al manifestărilor endotoxice. Glucocorticoizii au efect protector anti-endotoxic, probabil prin modificarea permeabilităţii capilare.

Endotoxinele nu au rol în colonizarea şi penetrarea suprafeţei mucoase, deoarece lipidul A are o localizare profundă în membrana externă. Tulpinile invazive şi neinvazive de *Salmonella* produc cantităţi similare de endotoxină. Endotoxina are rol în iniţierea infecţiei, probabil prin inducerea unei scăderi tranzitorii a capacităţii de apărare a gazdei, prin întârzierea declanşării unui răspuns inflamator.

*Dozele mici* de toxină măresc rezistenţa organismului la infecţiile bacteriene şi virale prin stimularea activităţii fagocitare şi respectiv, a producerii de interferon.

Endotoxinele iniţiază calea alternă a activării complementului, dar efectul nu este bacterioliza, deoarece reacţia se produce la distanţă de membrana externă. LPS stimulează răspunsul imun mediat humoral, prin stimularea nespecifică, policlonală a limfocitelor B, iar *in vitro* au efect mitogenic asupra limfocitelor B. LPS au proprietăţi adjuvante, deoarece stimulează răspunsul imun specific faţă de un antigen administrat simultan.

*Efecte toxice*

*Dozele mari* de endotoxine determină o serie de manifestări patologice sistemice, nespecifice:

– *hipertermie* (febră), prin acţiunea lor asupra centrilor termoreglării, chiar după administrarea unor doze minimale. Inducerea febrei este semnul marcant al toxicităţii LPS. Macrofagul activat de LPS, secretă câteva citokine (IL-1, TNF α, IFN β), care stimulează sinteza prostaglandinelor (PG)*. IL-1

Scanned with OKEN Scanner

este factorul pirogen endogen, pentru că stimulează sinteza de prostaglandine, active asupra centrului hipotalamic al termogenezei, producând febră. Starea febrilă se instalează brusc, este monofazică şi este răspunsul indirect al hipotalamusului la IL-1 şi la TNF, mediat de sinteza crescută a PG;

* Membranele biologice sunt depozite pentru precursorii mediatorilor derivaţi din lipide. Răspunsul celular este însoţit de remodelarea rapidă a lipidelor membranare sub acţiunea lipazelor activate. Lipazele includ fosfolipaza $A_2$, D şi C. Se generează rapid lipide bioactive, cu funcţie de mediatori. PG formează o familie de acizi graşi nesaturaţi cu catenă de 20 atomi de C. Precursorul PG este *acidul arachidonic* (nesaturat), legat esteric de $C_2$ al fosfolipidelor membranare de unde este eliberat sub acţiunea fosfolipazei $A_2$. Acidul arachidonic este precursorul sintezei compuşilor icozanoidici (PG şi leucotriene – LT) şi este convertit la endoperoxizi ciclici (PG) sub acţiunea *ciclo-oxigenazei*. Sinteza acestei enzime este inhibată de aspirină şi indometacină, substanţe cu efect antifebril. Efectul lor antifebril se exercită prin inhibiţia sintezei PG. PG se sintetizează în monocite, macrofage, granulocite, dar şi în majoritatea celorlalte ţesuturi ale organismului uman şi animal. După sinteză sunt eliberate în circulaţie şi sunt inactivate în ficat, rinichi şi plămâni. PG sunt inhibitori ai reactivităţii imunitare, deoarece diminuă reactivitatea limfocitelor şi macrofagelor.

- *leucopenie* urmată de leucocitoză. Efectul se exercită direct şi rapid asupra leucocitelor. Ele părăsesc patul vascular şi se retrag aproape instantaneu în plămân şi în alte ţesuturi, în proporţie de circa 60%. După circa 4 ore, numărul leucocitelor circulante creşte peste limitele normale. Creşte numărul hematiilor circulante, datorită eliberării în circulaţie a rezervelor celulare din centrele de formare şi depozitare a eritrocitelor;
- *modificări cardiovasculare*: legarea endotoxinei de celulele hepatice sau de alte celule induce eliberarea rapidă a aminelor biogene (histamina, serotonina) şi a peptidelor (bradikinina) din depozitele celulare. Aminele produc o hipertensiune tranzitorie, urmată de hipotensiune severă, hipovolemie şi formarea cheagurilor vasculare de fibrină. Endotoxinele activează sistemul de coagulare sanguină şi se produce coagulare intravasculară diseminată;
- *efecte metabolice*: inhibă sistemele enzimatice ale gluconeogenezei şi ale sintezei glicogenului.

Din punct de vedere clinic, dozele mari de endotoxina produc următoarea secvenţă de modificări: frison, febră, somnolenţă, dispnee, modificări ale dinamicii tranzitului intestinal, diaree sanguinolentă, hiperglicemie incipientă urmată de hipoglicemie, paralizie, comă, moarte. Acest tablou de modificări se succede în circa 24 de ore după injectarea preparatului la animalele sănătoase şi corespund stării de *şoc endotoxic*, consecinţă a endotoxemiei. Endotoxemia este rezultatul supraîncărcării celulelor cu rol de aparare, ca urmare a deversării endotoxinelor în circulaţie. Starea de endotoxemie nu este totdeauna urmată de şoc şi moarte. Nu se cunosc cauzele marilor diferenţe de răspuns şi reactivitate, la starea de endotoxemie. Socul fatal este consecinţa interacţiunii endotoxinei cu sistemul de coagulare a sângelui, pe care îl activează şi îl amplifică. S-a emis ipoteza că instalarea şocului ireversibil este favorizată de absorbţia în sânge a endotoxinelor

Scanned with OKEN Scanner

produse de microbiota intestinală. În mod normal, mecanismele de detoxifiere a organismului sunt eficiente, dar starea de şoc se instalează consecutiv diverselor tulburări funcţionale, care împiedică o reactivitate optimă faţă de infecţia cu bacterii Gram negative.

*Starea de şoc* este indusă de bacteriemia cu bacterii Gram negative şi se datorează eliberării masive a endotoxinei, spontană sau consecutivă lizei bacteriene. Unii pacienţi trataţi cu antibiotice eficiente pot să sucombe datorită şocului produs de eliberarea masivă a endotoxinelor din bacteriile omorâte. Antibioticele β-lactamice sunt cele mai eficiente pentru eliberarea endotoxinei în exces. Capacitatea lor de a elibera endotoxina este dependentă de afinitatea de legare de diferite proteine ale membranei externe.

Şocul este consecinţa unui *răspuns inflamator* intens la produsele de origine microbiană. Inflamaţia este reacţia de mobilizare a componentelor humorale (anticorpi, complement) şi celulare (neutrofile, macrofage, limfocite T) ale sistemului imunitar. Celulele activate, dar în special celulele seriei monocit/macrofag iniţiază sinteza unei cantităţi mari de mediatori specializaţi: citokine, chemochine, mediatori lipidici. Mediatorii alterează permeabilitatea vasculară şi fluxul sanguin. Creşte aderenţa fagocitelor la celulele endoteliale şi se intensifică migrarea leucocitelor în ţesut. De cele mai multe ori, procesul inflamator are ca rezultat eliminarea agentului infecţios, sterilizarea focarului şi regenerarea tisulară. Răspunsul biologic net inflamaţiei este determinat de raportul mediatorilor proinflamatorii şi anti-inflamatorii. Şocul este consecinţa unui dezechilibru major în favoarea mediatorilor proinflamatorii. TNF şi IL-1 sunt consideraţi a fi cei mai importanţi mediatori ai răspunsului inflamator. *In vivo*, acţiunea lor este sinergică, într-o infecţie locală sau sistemică. Blocarea ambelor citokine cu anticorpi specifici diminuă mult severitatea inflamaţiei.

Injectarea IL-1 şi a TNF la om şi la animale este urmată de scăderea rapidă a tensiunii arteriale. Mecanismul constă în sinteza produselor pe calea ciclooxigenazei, a factorului de agregare plachetară şi a oxidului nitric (NO).

În infecţiile severe, rolul IL-1 şi al TNF nu este numai autocrin, ci şi paracrin, deoarece sunt în cantităţi detectabile în sângele circulant, deşi inconstant şi variabil.

În condiţii severe, procesul inflamator are consecinţe patologice care culminează cu insuficienţa funcţională a mai multor organe, urmată de şoc şi moarte.

Atât în infecţiile minore, cât şi în cele majore este produs acelaşi set de mediatori. Ceea ce diferenţiază cele două tipuri de infecţii este *cantitatea de mediatori*. Aceste evoluţii diferite, probabil se datorează reactivităţii imunitare şi mai puţin agentului infecţios. Pacienţii cu antecedente sau cu o maladie de fond răspund mai amplu, cu consecinţe defavorabile, la o infecţie bacteriană.

Antigenele bacteriene majore, care constituie factorii de virulenţă, stimulatori ai răspunsului inflamator sunt: LPS, exotoxinele bacteriilor Gram pozitive şi lipoarabinomananul (LAM) din peretele micobacteriilor.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru detectarea *endotoxinelor circulante* se pot folosi două teste sensibile:

Testul *tegumentar* al epinefrinei necesită transferul pasiv al plasmei de analizat la iepure şi este urmărită prin injecţie intradermică de epinefrină. În cazul în care cantitatea de endotoxină este suficient de mare, la locul injecţiei epinefrinei se produce o reacţie inflamatorie intensă. Testul detectează nivelul endotoxemiei.

*Testul lizatului de Limulus* se bazează pe faptul că endotoxinele interacţionează cu proteinele din amoebocitele crabului potcoavă şi le precipită, formând un gel. Tehnica detectează cantităţi de endotoxine serice de ordinul nanogramelor.

### *Rolul imunomodulator al altor antigene bacteriene*

Rolul patologic al citokinelor în infecţii s-a evidenţiat în starea de şoc septic, ca rezultat al eliberării endotoxinelor şi sintezei citokinelor proinflamatorii: IL-1, IL-6 şi TNF. Acestea induc sinteza altor mediatori: citokine chimiotactice (IL-8), prostaglandine şi leucotriene (derivate din acidul arachidonic), molecule de aderenţă ale celulelor endoteliale.

Şocul septic este condiţia acută, dar aceleaşi citokine proinflamatorii sunt implicate în patologia bolilor infecţioase cronice – lepra, tuberculoza, maladia periodontală. Ele sunt esenţiale pentru inducerea răspunsului de fază acută, parte integrantă a apărării înăscute faţă de microorganismele infecţioase.

Pentru evidenţierea rolului diferitelor citokine, se foloseşte tehnica recombinării omologe pentru a inactiva genele specifice la şoarece, astfel încât animalele nu pot să sintetizeze proteina codificată de gena respectivă (*knockout*). Şoarecii *knockout* pentru IL-2 sau IL-10 mor datorită unui răspuns inflamator neadecvat (amplificat) faţă de antigenele microbiotei proprii, ceea ce sugerează că aceste citokine au acţiune inflamatorie.

LPS şi endotoxina au avut rol important pentru înţelegerea biologiei citokinelor în ultimii 30-40 de ani, dar şi alte componente bacteriene sunt inductoare ale sintezei citokinelor. Bacteriile produc o varietate de factori care favorizează capacitatea lor de a invada gazda, de a se răspândi şi de a supravieţui acţiunii mecanismelor de apărare ale gazdei, grupate în 4 clase: *adezine, invazine, agresine* şi *impedine*.

Moleculele inductoare ale citokinelor sunt factori de virulenţă, dar nu aparţin claselor citate. Componentele inductoare ale sintezei citokinelor modulează activitatea unor categorii diverse de celule, cu consecinţe patologice aparţin grupului *modulinelor*. Cel mai reprezentativ component al acestei clase de factori de virulenţă este LPS.

*Proteinele membranei externe* (OMP) reprezintă circa 50% din greutatea uscată a acestei structuri la bacteriile Gram negative. La *Escherichia coli*, prin metode imunochimice s-au identificat peste 20. Unele au rol în procesele de transport şi aparţin *permeazelor* şi *porinelor*. Unele sunt inductoare ale sintezei citokinelor.

Scanned with OKEN Scanner

*Porinele* sunt proteine trimere care străbat membrana externă şi conţin un por central cu diametrul de circa 1 nm. Sunt permeabile pentru molecule mai mici de 600 Da.

*Proteinele asociate lipidului A* al LPS formează complexul denumit „endotoxină". Spre deosebire de LPS pure (fără proteine), endotoxina este mitogenă pentru limfocite. Complexul LPS-proteine ale membranei externe (endotoxina) rezultă prin extracţia cu acid tricloracetic sau butanol.

*Proteinele fimbriale*. Fimbriile sunt structuri alungite, originare în citoplasmă, alcătuite dintr-o proteină hidrofobă - *pilina*. Funcţia lor este medierea aderenţei de celulele gazdă sau de alte bacterii, prin intermediul receptorilor specifici. Injectarea pililor izolaţi de la *Escherichia coli*, la şoarece, a stimulat eliberarea IL-6.

*Proteina A* de *Staphylococcus aureus* (42 kDa) interacţionează nespecific cu regiunea Fc a moleculelor de imunoglobuline de la mamifere şi stimulează celulele mononucleare să elibereze IL-1, IL-4, IL-6, TNF-α, IFN-γ.

*Proteinele de stress* se sintetizează în celulele bacteriene supuse stressului de mediu. Funcţia principală a acestor molecule este asigurarea plierii corecte a moleculelor de proteine, dar sunt antigenice şi s-a demonstrat capacitatea lor de a stimula eliberarea citokinelor *in vitro*. hsp de 65 kDa de la *Mycobacterium leprae* induce sinteza ARNm pentru TNF într-o linie celulară monocitară.

*Lipoproteinele* se găsesc în membrana citoplasmatică şi în peretele celular la Gram pozitive şi Gram negative. Lipoproteina Braun de *Escherichia coli* (ancorează membrana externă de stratul peptidoglicanic) este una dintre cele mai abundente proteine ale acestui organism. Pare să aibă rol în stimularea sintezei citokinelor de către monocite.

*Polizaharidele capsulare* au rol important în virulenţa bacteriană, deoarece împiedică fagocitoza sau inhibă activarea complementului. Polizaharidul capsular de la *Staphylococcus aureus* stimulează eliberarea IL-1β, IL-6, IL-8 şi a TNF-α din monocite.

*Peptidoglicanul*. Cea mai mică unitate structurală comună a peptidoglicanului este N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamina (MDP). Peretele celular purificat de la bacteriile Gram negative stimulează eliberarea IL-6 şi a TNF-α din monocitele circulante. Celulele Kupffer eliberează IL-1 şi TNF-α după expunerea la peptidil-polizaharidul de *Streptococcus pyogenes*.

Fragmentele mici de peptidoglican de la *Bordetella pertussis*, denumite *citotoxină traheală*, lezează epiteliul căilor aeriene şi are efecte patologice. În celulele epiteliale ale tractului respirator, după contactul cu citotoxina traheală se acumulează rapid IL-1, care probabil determină efectele patologice.

*Acizii teichoici* (AT) sunt componente majore ale peretelui celular la bacteriile Gram pozitive. Acizii teichoici constau din catene de glicerol, ribitol, manitol sau glucide legate prin punţi fosfodiesterice şi sunt ataşate de resturile de acid muramic ale peptidoglicanului.

Scanned with OKEN Scanner

*Acizii lipoteichoici* (ALT) sunt constituiţi din lanţuri de glicerol-P, cu D-alanina şi glucide ca substituienţi, ataşate de un glicolipid (sau de un diglicerid) din membrana citoplasmatică.

AT şi ALT sunt antigenici şi adeseori constituie anigenele somatice majore ale bacteriilor Gram pozitive, echivalente LPS, deşi LPS au potenţial mai mare al activităţii biologice.

Bacteriile Gram pozitive pot produce o stare asemănătoare celei de şoc septic, deoarece peptidoglicanul şi AT sunt componenţi echivalenţi ai LPS şi stimulează sinteza citokinelor inductoare ae şocului la pacienţii infectaţi cu bacterii Gram pozitive.

În peretele micobacteriilor, stratul de peptidoglican este acoperit de straturi bogate în lipide, care pot să reprezinte până la 60% din greutatea uscată a peretelui, ceea ce îi conferă proprietăţi hidrofobe. Din perete s-au ixolat lipide, glicolipide şi lipoproteine. Câteva dintre acestea conţin acizi micolici, markeri biochimici ai g. *Mycobacterium*, *Nocardia* şi *Corynebacterium*.

*Lipoarabinomananul* (LAM), componenta majoră a peretelui la *Mycobacterium*, are efecte imunomodulatoare şi antiinflamatoare, care favorizează supravieţuirea micobacteriilor:

- inhibă proliferarea limfocitelor T, datorită interferenţei cu prelucrarea antigenelor;
- inhibă activarea macrofagelor de către IFN-γ;
- neutralizează radicalii liberi ai $O_2$.

LAM stimulează monocitele sanguine umane şi activează macrofagele peritoneale pentru eliberarea TNF-α. Polimixina B, un inhibitor cunoscut al al activităţii LPS, inactivează LAM, ceea ce sugerează că LAM şi LPS au mecanisme de acţiune foarte asemănătoare asupra celulelor.

Proteazele, datorită potenţialului lor de a leza ţesuturile, sunt factori de virulenţă. Ele interacţionează cu reţeaua citokinelor, a căror secreţie o stimulează sau o inhibă. De exemplu, citokina proinflamatorie IL-1β se sintetizează ca un precursor inactiv de 31 kDa şi este clivat de proteaza specifică ICE (*i*nterleukin-*c*onverting *e*nzyme) la Asp-116 şi Ala-117, pentru a rezulta IL-1 activă. Exotoxina B de *Streptococcus pyogenes*, o cistein-protează, clivează acelaşi precursor la His-115 şi Asp-116 şi eliberează IL-1 activă. Această protează poae stimula sinteza locală a IL-1 şi poate induce efecte patologice tisulare.

Numeroase bacterii secretă *exotoxine*, care acţionează asupra unei mari diversităţi de ţesuturi şi celule. Exotoxinele au o proprietate unică: induc eliberarea citokinelor în celule care nu sunt în mod obligatoriu ţinta lor.

*Listeriolizina*, cel mai caracteristic factor de virulenţă al bacteriei intracelulare *Listeria monocytogenes*, induce sinteza IL-1 în macrofage.

*Toxina pertusică*, de natură proteică, stimulează sinteza IL-4, ceea ce explică efectul stimulator al acestei toxine asupra sintezei de IgE.

Scanned with OKEN Scanner

*Pneumolizina* de *Streptococcus pneumoniae* şi toxina β de *Clostridium difficile* (agentul colitei pseudomembranoase) stimulează sinteza citokinelor proinflamatorii.

Unele antigene bacteriene au capacitatea de a stimula un număr mare de clone de limfocite T la om şi şoarece, în contrast cu numărul mic de clone activate de antigenele peptidice, ceea ce a condus la denumirea de *superantigene*. Cele mai multe superantigene sunt produse de *Staphylococcus aureus* şi de speciile de *Streptococcus*.

*Enterotoxinele* de *Staphylococcus aureus*, ce constau din 6 serotipuri diferite (A-E) au efecte superantigenice şi induc sinteza rapidă a citokinelor: TNF, IL-1, IL-6, IFN-γ.

Mecanismele activării răspunsului imun de către exotoxinele bacteriilor Gram pozitive sunt aceleaşi care activează funcţia imunitară faţă de antigenele proteice exogene. Exotoxinele, cunoscute ca superantigene datorită imunogenităţii înalte, sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH II ale macrofagelor sau altor celule accesorii (celule dendritice). Complexul CMH-superantigen este recunoscut de receptorul de antigen al limfocitelor T. Celula T se activează şi proliferează, o dată cu secreţia de de limfochine.

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul II*

# TOXINE FUNGICE

## Importanţa practică a fungilor

Este evident că organismele din regnul *Fungi* nu au fost studiate pe măsura importanţei teoretice şi practice a acestui grup, dar lipsa de informaţie se resimte în special cu privire la *importanţa practică a fungilor*.

Regnul *Fungi* include macromicetele, ciupercile consolă şi pe cele cu corp sferic din genurile *Lycoperdon şi Calvatia*, ruginile, tăciunii şi mălurile, fungii microscopici filamentoşi şi levurile, precum şi organisme mai puţin cunoscute. S-au descris circa 70 000 de specii de fungi, dar unele estimări sugerează că numărul speciilor fungice este mult mai mare, putând să atingă 1,5 milioane.

Fungii au un rol deosebit de important în natură, deoarece, fiind în primul rând *descompunători ai materiei organice*, redau elementele biogene (C, H, O, N, S, P etc.) circuitului natural. Fungii sunt organisme cu un potenţial degradativ foarte mare, datorită complexităţii şi diversităţii enzimelor pe care le secretă. Grupul fungilor descompune toate categoriile de macromolecule caracteristice lumii vii: polizaharide, acizi organici, lignine, hidrocarburi aromatice şi alifatice, zaharuri, alcooli, aminoacizi, purine, lipide, proteine, acizi nucleici. O specie fungică oarecare poate să descompună numai anumite componente ale ţesuturilor vegetale şi animale. Descompunerea substratului necesită *acţiunea cooperantă* a mai multor specii de microorganisme.

Acţiunea degradativă a fungilor produce mari pierderi de fructe şi alte produse vegetale în depozite. Fructele uscate (în special prunele) sunt vulnerabile la atacul fungic, deoarece suprafaţa lor e bogată în glucide. Cerealele depozitate şi furajele sunt deteriorate de fungi dacă nu sunt bine uscate la momentul depozitării.

Unii reprezentanţi ai fungilor au o importanţă economică de prim ordin în *bioindustria micologică* (producerea antibioticelor, a acizilor organici etc.), iar fungii paraziţi prezintă un *interes medical* major datorită frecvenţei mari a micozelor în populaţia umană. Fungii patogeni pentru plante reprezintă un domeniu cu implicaţii mari teoretice, dar în special pentru producţia agricolă.

Ascomicetele au o importanţă economică deosebită, atât prin potenţialul lor distructiv, cât şi prin efectele benefice. Levurile sunt utilizate în *producerea industrială a băuturilor alcoolice de fermentaţie* (vin, bere, whisky) *şi în industria panificaţiei*, iar *Claviceps purpurea* (cornul secarei) este folosită ca sursă de medicamente (ergotina).

Scanned with OKEN Scanner

Unele ciuperci macromicete sunt *comestibile*, iar altele sunt *otrăvitoare*, datorită toxinelor pe care le sintetizează. *Morchella* (zbârciogul) şi *Tuber* (trufe) sunt ascomicete comestibile. *Tuber* este o ciupercă sferică subterană, care creşte în jurul anumitor specii de stejar. Savoarea unică a acestor ciuperci le face să fie foarte căutate de gastronomi, deşi valoarea lor nutritivă este scăzută.

Dintre macromicete, *Agaricus bisporus* este cultivată în amenajări speciale.

Cei mai importanţi fungi din grupul deuteromicetelor aparţin genului *Penicillium*. Unele specii de *Penicillium* sunt producătoare de *penicilină*. Altele (*P. roqueforti* şi *P. camemberti*) conferă savoarea distinctă şi consistenţa moale a brânzeturilor de Roquefort şi Camembert, datorită proteazelor eliberate în substrat. Miceliul se dezvoltă preponderent la suprafaţă, dar pătrunde şi în substrat şi prin acţiunea sa enzimatică îi diminuă consistenţa şi îi conferă o savoare unică.

Majoritatea fungilor sunt organisme *saprobionte*, adică trăiesc pe materia organică vegetală în descompunere şi folosesc moleculele simple eliberate prin hidroliza macromoleculelor. Un număr important de fungi sunt *biotrofi* (adică trăiesc în relaţie directă cu alte organisme): unii realizează asociaţii simbiotice cu plantele (inclusiv cu algele), cu animalele (artropode) şi cu procariotele, rezultând licheni, micorize sau fungi endofitici din frunze şi tulpini. Circa 80% dintre plante au micorize. Fungii endofitici ar proteja plantele de ierbivore şi ar influenţa, prin sinteza fitohormonilor, biologia reproducerii.

Fungii sunt cei mai importanţi patogeni ai plantelor: ruginile, tăciunii, mălurile produc pierderi economice foarte mari în culturile de cereale. Fungii paraziţi pătrund în organismul vegetal prin înţepăturile insectelor, prin deschideri naturale (stomate) şi prin invazia directă a epidermei. Plantele sunt mai sensibile la infecţie în condiţii de stres hidric.

Fungii produc frecvente infecţii la om şi animale: *Pneumocystis* (produce pneumonia la persoanele imunosupresate), *Ajellomyces* (produce blastomicoza şi histoplasmoza), *Cryptococcus* etc.

### Tipuri de infecţii fungice

Fungii sunt agenţi patogeni majori ai plantelor şi insectelor, dar sunt mai puţin importanţi ca agenţi patogeni ai vertebratelor. Circa 50 de specii de fungi sunt patogene pentru om şi animale. Creşterea fungilor în ţesuturile gazdelor animale şi umane poartă denumirea generică de *micoză*. Gravitatea micozelor variază, de la cele care produc un disconfort minim, până la cele care pericliteză viaţa, aşa cum este aspergiloza invazivă.

Fungii patogeni care produc micoze pot fi împărţiţi în două categorii:

- fungi *patogeni primari* (*Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum*);
- fungi *oportunişti*. Majoritatea fungilor patogeni pentru om şi animalele superioare sunt agenţi infecţioşi oportunişti, care invadează ţesuturile organismelor cu potenţial scăzut de apărare.

Scanned with OKEN Scanner

Infecţia fungică a ţesuturilor umane şi animale se produce pe fondul unor condiţii locale favorizante. Din această cauză, transmiterea infecţiei de la un organism la altul este rară. În general, maladiile fungice nu sunt contagioase.

*Micozele* pot fi împărţite în două categorii mari:

– infecţii *sistemice* sau *profunde*, în care agentul patogen este larg diseminat în organism şi creşte în diferite organe şi ţesuturi;
– micozele *superficiale*, care includ infecţii ale pielii, părului, unghiilor. Unii fungi produc numai un tip de infecţie, iar altele, pe amândouă.

Pentru majoritatea fungilor patogeni nu se cunosc stadii de înmulţire sexuată şi de aceea poziţia lor sistematică este incertă. Unele micoze sistemice sunt produse de levuri. Altele sunt cauzate de fungi dimorfici, care cresc ca levuri *in vivo* (la 37°) şi ca miceliu la temperatură mai mică, *in vitro*, pe medii artificiale.

Fungii patogeni trăiesc în sol şi pătrund în organism pe cale respiratorie, fiind inhalaţi odată cu aerul. De la poarta de intrare, agentul infecţios se disemineză în organism şi se instituie o infecţie cronică, cu simptome foarte variate. Infecţiile fungice fatale sunt rare.

Infecţiile fungice apar frecvent, ca o consecinţă a eliminării microbiotei normale, prin terapie orală cu antibiotice. Câţiva fungi (*Cryptococcus neoformans, Coccidioides imitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitides*) produc infecţii pulmonare foarte asemănătoare prin manifestările clinice, cu tuberculoza.

Micozele superficiale sunt cauzate, în primul rând, de fungi micelieni (*Microsporum, Trichophyton, Epidermophyton*), cu afinitate pentru ţesuturile care conţin keratina (piele, păr, unghii) şi produc enzima necesară degradării acestei proteine. Unii fungi cresc pe suprafaţa firului de păr, iar alţii la interior. Vârsta este un factor important care condiţionează sensibilitatea la infecţie: *impetigo* al pielii capului este frecventă la copii şi rară la adulţi, iar *infecţia interdigitală* este frecventă la adulţi şi rară la copii. Acizii graşi nesaturaţi din secreţia glandelor sebacee ale adultului au acţiune antifungică, ceea ce explică rezistenţa mai mare la infecţiile fungice superficiale. Una dintre substanţele antifungice, *acidul undecilenic*, se adaugă în compoziţia multor unguente, folosite în controlul infecţiilor fungice ale pielii.

Infecţia interdigitală este favorizată de umiditatea locală crescută şi este produsă de fungi din genul *Epidermophyton.*

Fungii care produc infecţii superficiale la om şi animale se numesc *dermatomicete*. Majoritatea infecţiilor cu dermatomicete se pot trata eficient cu *griseofulvina*, un antibiotic antifungic produs de *Penicillium griseofulvum.* Griseofulvina se concentrează în celulele epidermice, la valori inhibitoare pentru creşterea fungilor.

Micozele *intermediare* sunt considerate acelea care produc leziuni epidermice, subcutanate, ale mucoaselor sau ale ţesutului pulmonar. Infecţia este realizată prin inhalarea sporilor, prin contaminarea rănilor sau prin ingestie şi se poate extinde şi

Scanned with OKEN Scanner

în alte ţesuturi, la diferite profunzimi. Cele mai tipice infecţii intermediare sunt candidoza şi aspergiloza.

*Candidoza* este produsă de variate specii de *Candida*, în special *Candida albicans*, din grupul *fungilor imperfecti*. În procesul patologic se prezintă sub forma unei levuri, dar formează şi structuri miceliene. Micoza se localizează, în primul rând, la nivelul membranelor mucoase, dar şi în piele sau plămân. Micozele mucoasei bucale a nou-născutului sunt comune, iar la adult, *Candida* produce procese patologice bucale, tonsilare şi vaginale.

*Aspergiloza*, cauzată de *Aspergillus fumigatus* este frecventă la puii de găină în primele zile după ecloziune, la care produce micoze de amploarea unei epidemii. Miceliul se dezvoltă abundent în plămân şi respiraţia devine imposibilă. Produce avortul la vacă, oaie etc. Omul prezintă rezistenţă naturală la infecţia cu *Aspergillus fumigatus*. Cazurile de îmbolnăvire sunt rare.

Grupul fungilor patogeni nu include *fungii alergici* şi pe cei care *eliberează micotoxine* în substratul în care cresc. Aceste două categorii nu intră în grupul fungilor patogeni pentru că nu produc maladii în sensul strict, adică nu sunt contagioşi.

Capacitatea fungilor de a sintetiza toxine este variabilă în funcţie de substratul pe care se dezvoltă. Toxinele sunt asociate în primul rând cu sporii.

Nu toţi fungii produc micotoxine. Prezenţa organismelor competitive pare să fie importantă, deoarece microfungii cultivaţi în cultură pură în laborator, pierd potenţialul toxic.

## Toxine produse de fungii microscopici (Micotoxine)

Fungii produc o largă varietate de *metaboliţi secundari*, a căror semnificaţie pentru specia producătoare, adeseori nu este cunoscută, dar au importanţă practică medicală, industrială sau agricolă. Unele substanţe din categoria metaboliţilor secundari sunt toxice, iar altele (antibioticele) sunt benefice pentru om şi animale.

*Micotoxinele* sunt substanţe toxice cu moleculă mică, produse de fungii filamentoşi ca metaboliţi secundari. Din punct de vedere structural sunt molecule heterogene, dar se reunesc pe baza capacităţii lor de a produce intoxicaţia acută sau cronică asociată cu manifestări clinice sau chiar moartea la om şi animale. Contaminarea cu fungi din sol a produselor alimentare, a cerealelor şi chiar a alimentelor preparate, este aproape inevitabilă. Depozitarea în condiţii improprii, favorabile creşterii fungilor, alterează caracteristicile de gust şi de miros ale produsului. Cei mai mulţi microfungi care cresc pe alimente sunt inofensivi. Dar creşterea unor microfungi filamentoşi pe substraturi alimentare este însoţită de sinteza şi eliminarea unor micotoxine puternice, care produc îmbolnăvirea sau chiar moartea omului şi animalelor.

Existenţa micotoxinelor s-a evidenţiat în a doua jumătate a secolului XX. În 1962, 100 000 de curcani şi un număr mare de alte păsări domestice au murit în

Scanned with OKEN Scanner

Anglia, fapt care a stimulat izolarea şi identificarea primei micotoxine. Iniţial, maladia s-a considerat că este datorată unui virus şi sindromul s-a denumit „boala x a curcanilor". Intoxicaţia, aşa cum s-a dovedit ulterior, s-a datorat aflatoxinelor, consecutivă consumului furajelor contaminate cu *Aspergillus flavus*.

Substanţele toxice produse de fungi sunt foarte diverse, peste 400 de micotoxine, ce aparţin la cel puţin 21 clase diferite din punct de vedere chimic. Toate micotoxinele sunt compuşi organici complecşi cu gr. mol. cuprinsă între 200–800 Da, nevolatile la temperatura mediului extern.

Nu toţi compuşii toxici sintetizaţi de fungi intră în categoria micotoxinelor. Produsele fungice care inhibă creşterea bacteriilor (penicilina) sunt denumite *antibiotice*. Cele cu efecte toxice pentru plante se numesc *fitotoxine*, un termen confuz care semnifică şi toxinele produse de plante.

Fungii toxigeni sunt reprezentaţi de cel puţin 350 specii, la care omul se expune prin consumul alimentelor contaminate sau ocazional prin inhalare şi determină o varietate de stări patologice, de la intoxicaţiile acute datorate consumului *macromicetelor* otrăvitoare, până la neoplaziile induse de aflatoxine.

Fungii producători de toxine nu trebuie în mod obligatoriu să fie prezenţi în substrat pentru a produce intoxicarea, deoarece toxinele eliberate difuzează la distanţă de locul producerii.

Producerea micotoxinelor are cea mai mare frecvenţă în depozitele de cereale, arahide şi nuci la umiditate mai mare de 15%. În regiunile tropicale, datorită umidităţii permanent crescute, dezvoltarea fungilor în produsele depozitate este greu de controlat. Este posibil ca apariţia endemică a neoplaziilor hepatice (în anumite zone din Africa) să se datoreze creşterii fungilor şi producerii aflatoxinelor în produsele depozitate. Dată fiind importanţa lor pentru inducerea unor stări patologice, multe micotoxine au fost caracterizate chimic şi s-au elaborat metode pentru depistarea lor în produsele alimentare.

Micotoxinele produc îmbolnăviri toxice la om şi animale, denumite *micotoxicoze*[*].

[*] Mary Matossian – istoric şi autor al lucrării "Poisons of the Past", a presupus că scăderea populaţiei în Europa, înainte de 1750, s-a datorat consumului de cereale contaminate cu fungi producători de micotoxine. Efectul defavorabil al micotoxinelor ar fi constat în reducerea fertilităţii şi duratei de viaţă. Între 1750 şi 1850, populaţia Europei s-a dublat, datorită schimbării dietei.

Toxinele fungice prezintă riscuri majore pentru sănătatea omului şi animalelor care consumă alimente şi respectiv furaje în care s-a dezvoltat miceliul producător de toxine. Limita superioară acceptată este de 20 p/bilion. De multe ori, prelucrarea alimentelor poate să mascheze prezenţa miceliului fungic, fără inactivarea micotoxinei. Contaminarea cu micotoxină poate fi stabilită prin analiză chimică. Alimentele şi furajele contaminate sunt consumate pe scară largă, dar cercetările privind efectele consumului sunt puţine. Studiile arată că folosirea alimentelor contaminate cu micotoxine prezintă riscul potenţial de a induce o largă varietate de maladii umane.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre factorii de mediu cu semnificaţie majoră, micotoxinele sunt cele care influenţează şi periclitează cel mai grav starea de sănătate a populaţiei. OMS atrage atenţia asupra pericolelor pentru sănătate, pe care le implică consumul alimentelor contaminate cu fungi.

Intoxicaţia cu toxine fungice are o semnificaţie deosebită pentru comunităţile care suferă de malnutriţie. În timpul tratamentului pentru malnutriţie, indivizii afectaţi suferă leziuni hepatice severe, datorate micotoxinelor. Intoxicaţia se produce din cauză că sursele proteice folosite pentru corectarea malnutriţiei (arahide, cereale) pot fi contaminate cu fungi producători de micotoxine.

Circa 25% din rezervele de hrană ale omenirii sunt contaminate cu micotoxine. Ingestia alimentelor contaminate cu o cantitate prag de micotoxine produce *intoxicaţia acută*, dar mai ales *cronică*. Intoxicaţia acută are un debut brusc, iar cea cronică este produsă de expunerea pentru o perioadă lungă de timp, rezultând malignităţi şi alte efecte ireversibile.

Dovada că o maladie aparţine grupului de micotoxicoze este adusă de existenţa unui raport doză/răspuns între micotoxină şi boală.

Riscurile majore pentru sănătatea omului şi animalelor se datorează consumului alimentelor şi furajelor contaminate cu fungi care produc *aflatoxine, trichotecene, ochratoxine, fumonisine, patulină, zearalenonă* etc.

Factorii care influenţează gradul de toxicitate al unei substanţe sunt multipli:

- rata de absorbţie din tractul intestinal în sânge;
- rata de transfer din sânge în celulele sensibile ;
- cinetica legării de reticulul endoplasmic şi rata de conversie ;
- rata de legare a intermediarilor toxici de molecule critice.

*Simptomele* unei micotoxicoze depind de tipul micotoxinei, de cantitatea şi durata expunerii, de vârsta, sexul şi de starea fiziologică generală a organismului expus. Efectele intoxicaţiei sunt diversificate de acţiunea sinergică a toxinelor care se găsesc de cele mai multe ori în amestec, de starea de nutriţie (în special de deficitul vitaminic), de abuzul de alcool etc. Semnele clinice acute şi leziunile cronice se produc în organele cele mai sensibile. Toxicitatea acută se manifestă rapid şi se datorează ingestiei unei cantităţi mari de micotoxine, iar toxicitatea cronică se datorează expunerii de lungă durată la doze mici de micotoxine. Micotoxicozele cronice sunt asociate cu întârzierea dezvoltării somatice, cu creşterea sensibilităţii la infecţii, emaciere şi sunt relativ comune la animale.

Dacă *micozele* cauzate de fungii oportunişti sunt în primul rând maladii ale lumii industrializate, *micotoxicozele* sunt mai comune în ţările subdezvoltate şi sunt rezultatul consumului alimentelor contaminate. Exceptând terapia de susţinere (dietă adecvată, hidratare), pentru micotoxicoze nu există tratamente specifice.

Cele mai comune specii producătoare aparţin genurilor: *Aspergillus, Claviceps, Fusarium, Penicillium, Alternaria, Cladosporium, Diplodia, Phoma, Phomopsis, Rhizopus, Sclerotinia, Stachybotris, Trichothecium, Pithomyces*.

Scanned with OKEN Scanner

### *Condiţiile sintezei micotoxinelor*

Micotoxinele sunt *metaboliţi secundari* şi pot contamina hrana şi furajele în absenţa elementelor fungice, după cum prezenţa fungilor toxigeni în hrană nu implică în mod obligatoriu prezenţa micotoxinelor.

Producerea metaboliţilor secundari începe târziu în timpul fazei de creştere, la intrarea în *faza staţionară*. Condiţiile de mediu necesare sporulării şi secreţiei metaboliţilor secundari sunt adeseori asemănătoare şi chiar mai stringente decât acelea necesare creşterii vegetative. S-a crezut că sinteza metaboliţilor este obligatorie pentru sporulare, dar unele tulpini sporulează chiar în absenţa producerii metaboliţilor secundari.

Cei mai mulţi metaboliţi secundari sunt sintetizaţi de organisme cu creştere filamentoasă şi cu morfologie relativ complexă.

Sinteza metaboliţilor secundari, la microorganisme, este asociată cu *procesele de sporulare*. Se disting 3 categorii de metaboliţi secundari a căror sinteză este declanşată de procesul de sporulare:

- *metaboliţi care activează sporularea* (acidul linoleic, la *Aspergillus nidulans*);
- *pigmenţii* structurilor de sporulare (melaninele necesare formării sau integrităţii sporilor sexuaţi şi asexuaţi). Melaninele sunt pigmenţi de culoare închisă care se formează prin polimerizarea oxidativă a compuşilor fenolici, se sintetizează în timpul sporulării şi sunt depozitaţi în peretele celular, având rol protector faţă de radiaţiile UV, dar sunt şi factori de virulenţă;
- *metaboliţi toxici* secretaţi la timpul sporulării (micotoxinele).

Multe produse naturale de importanţă medicală (antibiotice), alimentară, industrială sau agricolă sunt metaboliţi secundari.

Creşterea fungică şi sinteza toxinei sunt rezultatul interacţiunii dintre miceliul fungic, substrat şi condiţiile de mediu. Sinteza micotoxinelor este influenţată de condiţiile mediului de creştere al fungilor. Multe toxine sunt metaboliţi secundari, produşi în condiţii *suboptimale* de creştere sau în prezenţa unor cantităţi limitante de nutrienţi. Temperatura, umiditatea, aeraţia, pH-ul, rata de creştere influenţează masa fungică şi sinteza toxinelor. Factorul esenţial favorizant al creşterii fungilor în produsele alimentare, în cereale şi alimente este *umiditatea*. Datorită particularităţii condiţiilor favorizante ale sintezei există o variaţie considerabilă regională şi sezonieră a producerii micotoxinelor.

Cunoaşterea condiţiilor favorizante ale sintezei toxinelor este foarte importantă. Astfel, izolarea unei specii toxigene dintr-o sursă, nu este dovada prezenţei micotoxinei. Creşterea fungică nu este în mod obligatoriu însoţită de producerea toxinei. Condiţiile necesare sintezei toxinei sunt de cele mai multe ori, foarte diferite de cele necesare creşterii: de exemlu, *Fusarium tricinctum* produce cantităţi semnificative ale toxinei T-2 la 15°, dar mult mai mici la temperaturi superioare. Micotoxinele sunt sintetizate la *temperaturi inferioare* celor favorabile creşterii optime ale fungilor, cuprinse între 20–30°.

Scanned with OKEN Scanner

Nu există dovada că producerea micotoxinelor sporeşte virulenţa fungilor patogeni. *In vitro*, *Aspergillus fumigatus*, agentul aspergilozei pulmonare, produce *gliotoxine*, inhibitoare ale activării şi proliferării celulelor T şi macrofagelor. Gliotoxinele nu par a fi produse în cantitate semnificativă în infecţia pulmonară.

Micotoxinele sunt sintetizate în primul rând de fungi nepatogeni care cresc pe materia organică.

Cele mai multe alimente sunt susceptibile la atacul fungilor toxigenici cel puţin într-o fază a producerii, a transportului sau a depozitării. Stresul de mediu şi reducerea vigorii plantelor, predispun la infecţie cu fungi toxigenici. Fungii din seminţele încorporate în hrană pot fi distruşi odată cu expunerea la condiţii speciale de temperatură şi presiune în timpul măcinării şi prelucrării, dar micotoxinele termostabile rămân active.

Micotoxinele s-au izolat din grâu, orz, ovăz, porumb, orez, arahide, lapte, ouă, brânzeturi, fasole uscată, mere, suc de mere etc.

Potenţialul toxigenic al diferitelor tulpini de fungi variază. Uneori, fungi diferiţi produc aceiaşi micotoxină, iar alteori o singură specie de microfungi filamentoşi produce mai multe micotoxine.

Fungii infectează plantele şi produc micotoxine, uneori înainte de recoltare: *Claviceps, Fusarium*. Contaminarea post-recoltare este favorizată de umiditate.

Condiţiile de depozitare care favorizează creşterea fungilor şi sinteza micotoxinelor includ: umiditatea (datorată condensării în lăzi metalice, plafoane sparte) şi prelungirea timpului de depozitare. *Aspergillus* creşte pe porumbul şi arahidele depozitate în condiţii improprii. Fungii care se dezvoltă pe cerealele depozitate (*Aspergillus, Penicillium*) necesită un nivel mai scăzut de umiditate, comparativ cu fungii care contaminează cerealele în câmp, în diferite faze de dezvoltare.

Disponibilitatea apei pentru creşterea fungilor poate fi exprimată ca *umiditate a conţinutului* sau prin *coeficientul activităţii apei*. Valoarea coeficientului activităţii apei este dată de raportul presiunii vaporilor apei din substratul în care creşte miceliul şi cel al apei pure. În produsele depozitate, micotoxinele sunt produse la o umiditate de 13–16%.

Temperatura optimă pentru producerea toxinelor coincide, în general, cu temperatura optimă de creştere. Există excepţii: unele trichotecene pot fi produse de *Fusarium tricinctum* la + 4°.

Fungii microscopici se dezvoltă la un spectru larg al variaţiei pH. Uneori, pH-ul acid favorizează sinteza toxinei.

Sporii fungilor toxigeni sunt ubicvitari: *Aspergillus flavus* creşte pe seminţele de orez, sorg, arahide, porumb, grâu, soia şi furajele vegetale. Toxinele au fost produse experimental, în brânzeturi, carne, pâine.

Toxinele se pot detecta prin teste *in vivo* pe pui de raţă sau pe embrioni de găină sau prin metode analitice : cromatografie în strat subţire, metode cromatografice (HPLC- *H*igh *p*erformance *l*iquid *c*hromatography) sau prin metode imunologice cu AMC (*a*nticorpi *m*onoclonali).

Scanned with OKEN Scanner

### *Clasificarea micotoxinelor*

Clasificarea micotoxinelor se face în funcţie de *structura chimică* (lactone, cumarinice, indolice etc.) şi de *efectele patologice* asupra organismelor superioare. În funcţie de efectele clinice se disting *hepatotoxine, nefrotoxine, neurotoxine, imunotoxine* etc. În funcţie de efectele asupra celulelor sensibile se disting toxine *teratogene* (influenţează dezvoltarea embrionară), *mutagene, carcinogene* şi *alergene*.

Interacţiunea micotoxinelor cu moleculele substratului a constituit un subiect de larg interes pentru cercetători. Se disting mai multe mecanisme de acţiune:

- molecula de toxină reacţionează cu moleculele de enzimă, pe care le modifică şi le blochează acţiunea asupra substratului;
- toxina interacţionează cu un substrat pe care-l alterează, modificând reacţia enzimatică (de exemplu, interacţionează cu ADN sau cu ARN şi stopează sau alterează sinteza proteinelor) ;
- toxina reacţionează cu substratul unei enzime şi inhibă interacţiunea acestuia cu enzima;
- toxina reacţionează cu cofactori enzimatici, alterând funcţiile enzimei.

Deoarece câteva micotoxine inhibă sinteza proteinelor, o atenţie specială s-a acordat interacţiunii lor cu ADN, în încercarea de a elucida mecanismul de acţiune. Studiile s-au făcut în special pe sistemul aflatoxină-ADN, deoarece s-a evidenţiat că activitatea ARN-polimerazelor este sever inhibată după administrarea aflatoxinei $B_1$. Informaţiile privind interacţiunea cu ADN s-au obţinut prin analiza spectrofotometrică şi dializa la echilibru*.

*Dializa la echilibru este metoda de măsurare a afinităţii de legare a unor molecule mici, de moleculele proteice şi se bazează pe proprietatea moleculelor mici, de a traversa membrana de dializă, impermeabilă pentru proteină, ca şi pentru complexele toxină-proteină.

Soluţia concentrată de proteină se repartizează într-un sac de dializă şi se imersează într-un volum cunoscut de soluţie tampon ce conţine o concentraţie cunoscută a toxinei. Toxina liberă difuzează prin membrană, în compartimentul care conţine proteina şi se leagă parţial cu aceasta, formând complexe. La echilibru, se măsoară concentraţia toxinei libere la exterior, egală cu concentraţia toxinei libere din compartimentul intern. Concentraţia totală a toxinei în sacul de dializă este mai mare, deoarece o proporţie a moleculelor sale este legată de proteină.

Diferenţa dintre concentraţia iniţială şi cea finală a toxinei, în compartimentul exterior, măsoară afinitatea ei de legare cu proteina, în condiţiile unui exces de molecule de toxină, care favorizează disocierea complexelor proteină-toxină.

Aflatoxinele nu sunt singurele micotoxine care interacţionează cu acizii nucleici. S-a demonstrat legarea *furocumarinelor* (micotoxine produse de fungi care se dezvoltă în substratul vegetal) şi a *luteoschirinei* (o dihidroantrachinonă) produsă de *Penicillium islandicum*, cu acizii nucleici.

#### *Aflatoxine*

Cele mai cunoscute micotoxine sunt *aflatoxinele*, produse de *Aspergillus flavus, A. ochraceus, A. versicolor* şi *A. parasiticus*, toxice pentru om şi pentru multe specii de animale.

Scanned with OKEN Scanner

*Aspergillus flavus* este ubicvitar în natură, fiind un conglomerat de 11 specii cunoscute, care se dezvoltă în multe substraturi vegetale, inclusiv în cerealele depozitate. Creşte la temperaturi cuprinse între 7,5 şi 40°, cu un optim la 24–28° şi în 1–3 zile de creştere, organismul produce toxine, în special dacă umiditatea mediului depăşeşte 16%.

*Aspergillus flavus* rareori se dezvoltă în depozitele de cereale, în cultură pură. Înainte ca *A. flavus* să invadeze, de obicei substratul respectiv este invadat şi se dezvoltă alţi fungi (*A. glaucus, Candida pseudotropicalis*). Într-un substrat preinvadat de alţi fungi, indiferent de nivelul creşterii, *A. flavus* nu sintetizează aflatoxine. Pentru sinteza aflatoxinelor pe arahidele* depozitate, *A. flavus* trebuie să crească în cultură pură şi substratul să nu fi fost invadat anterior sau simultan de alţi fungi, ceea ce este o situaţie rară.

*Programul FDA (Food and Drug Administration) pentru producerea arahidelor prevede măsuri menite să asigure reducerea posibilităţii contaminării arahidelor cu fungi. Arahidele au importanţă economică în special în Africa, America centrală şi de sud şi în sudul Asiei, regiuni în care hrana este lipsită de aminoacizii esenţiali.

*Aspergillus flavus*, în mod obişnuit, nu contaminează cerealele în câmp, ci numai după depozitare, având un necesar mic de umiditate pentru dezvoltare.

Cantitatea de aflatoxine sintetizate diferă în funcţie de natura substratului. Deşi masa micelianã poate fi aceiaşi, cantitatea de aflatoxine va fi mai mare pe arahide decât pe seminţele de soia. Cerealele depozitate (grâu, porumb, orz, ovăz, sorg) prezintă un risc scăzut pentru sinteza aflatoxinelor.

Cantitatea de aflatoxine variază în funcţie de tulpina de *A. flavus*. Unele tulpini nu produc aflatoxine. Sinteza toxinei variază în funcţie de modul de utilizare a cerealelor. De exemplu, triburile Bantu din Africa preferă gustul acru al porumbului parţial depreciat de *Aspergillus*. Simplă coincidenţă sau existenţa unui raport de cauzalitate, populaţia are o incidenţă foarte înaltă a neoplaziei hepatice primare.

Aflatoxinele au fost notate cu $B_1$, $B_2$, $G_1$ şi $G_2$, în funcţie de fluorescenţa albastră (*b*lue) sau verde (*g*reen) pe care o emit în lumină ultravioletă cu lungimea de 365 nm şi a ordinii de separare în cromatografie. Aflatoxinele de tip 1 ($B_1$ şi $G_1$) diferă de tipul 2 ($B_2$ şi $G_2$) prin prezenţa unei legături duble în poziţia 2–3 a grupării bifuran, grupare care condiţionează reactivitatea aflatoxinelor şi interacţiunea cu acizii nucleici.

Multe dintre genele implicate în biosinteza aflatoxinelor au fost izolate şi majoritatea sunt localizate într-o grupare compactă.

Din punct de vedere *chimic*, aflatoxinele sunt *cicluri aromatice* complexe *bifurano-cumarinice*. $AFB_1$ şi $AFG_1$ conţin cicluri dihidrobisfuran şi se sintetizează din O-metilsterigmatocistină. Toxicitatea este condiţionată de gruparea lactonică a cumarinei. Molecula are mai mulţi heteroatomi de O, doi dintre ei aparţinând grupului bifuranic situat la extremitatea moleculei, căreia îi conferă o structură plană. Planaritatea moleculei face posibilă inserţia între perechile de baze azotate

Scanned with OKEN Scanner

ale acizilor nucleici. Inserţia între bazele acizilor nucleici nucleici condiţionează *genotoxicitatea* aflatoxinelor (fig. 27).

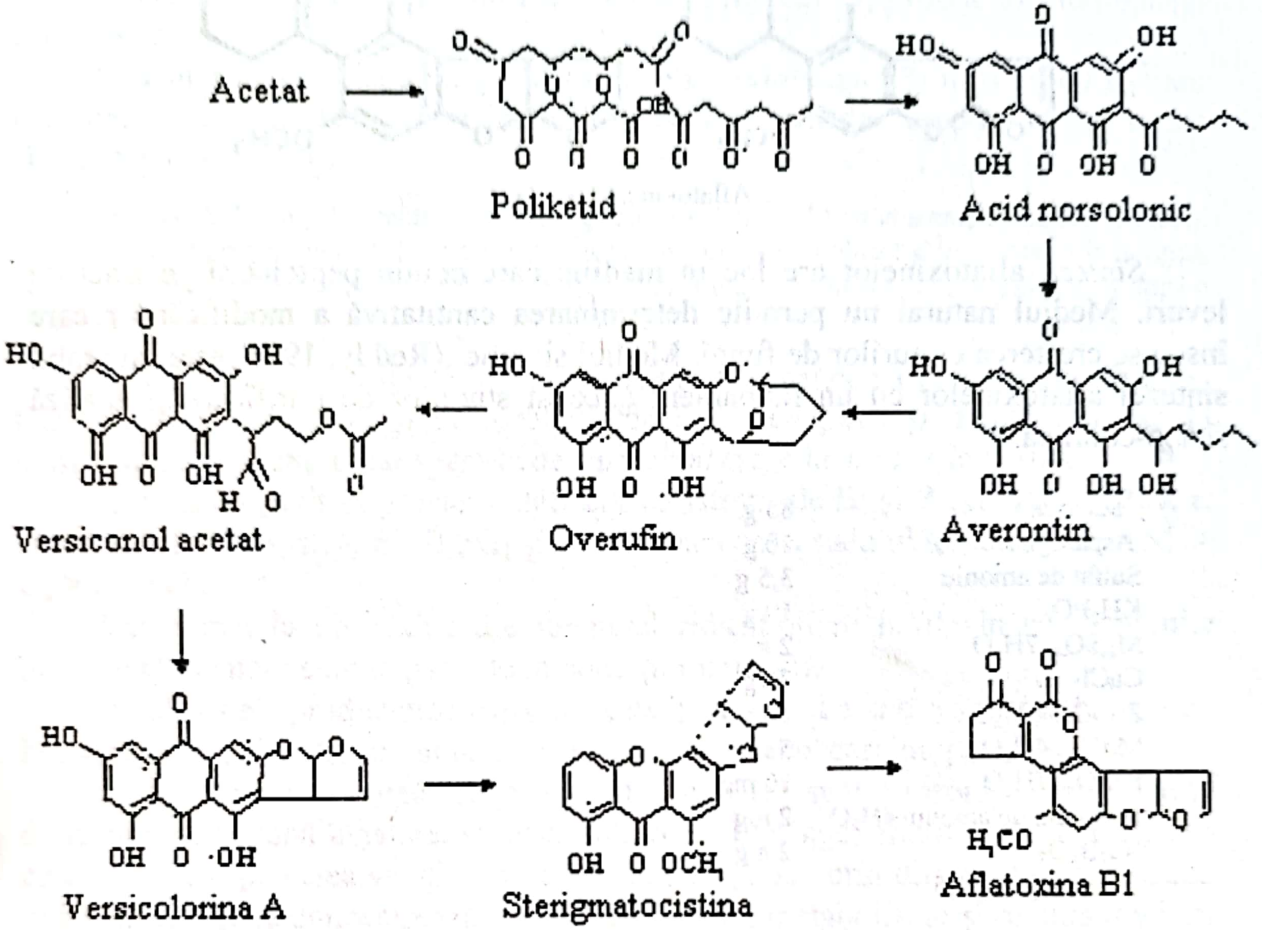
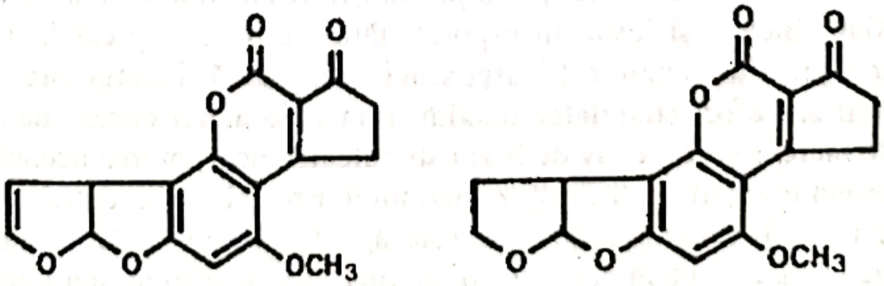


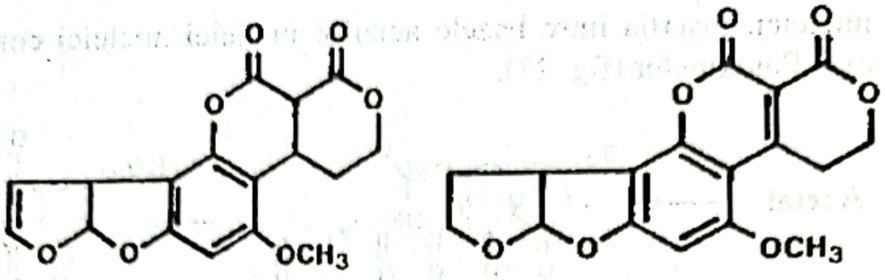

Fig. 27 – Calea metabolică a sintezei versicolorinei A şi a aflatoxinei $B_1$ este comună şi începe cu condensarea acetatului.

$AFB_2$ şi $AFG_2$ conţin inele tetrahidrobisfuran şi se sintetizează din dihidro-O-metilsterigmatocistină.

Aflatoxinele grupului B nu sunt precursorii aflatoxinelor grupului G. Cele două grupe de aflatoxine sunt produse independent din aceleaşi substraturi (O-metil-sterigmatocistina şi dihidro-O-metilsterigmatocistina).




Aflatoxinele $B_1$ şi $B_2$



Aflatoxinele $G_1$ şi $G_2$

*Sinteza* aflatoxinelor are loc în mediile care conţin peptonă şi extract de levuri. Mediul natural nu permite determinarea cantitativă a modificărilor care însoţesc creşterea culturilor de fungi. Mediul sintetic* (Reddy, 1971) este favorabil sintezei aflatoxinelor cu un randament adecvat studiilor de purificare şi analiză fizico-chimică:

| | |
|---|---|
| *Sucroză | 85 g |
| Asparagină | 10 g |
| Sulfat de amoniu | 3,5 g |
| $KH_2PO_4$ | 10 g |
| $MgSO_4 . 7H_2O$ | 2 g |
| $CaCl_2 . 2H_2O$ | 75 g |
| $ZnSO_4 . 7 H_2O$ | 10 mg |
| $MnCl_2 . 4H_2O$ | 5 mg |
| $FeSO_4 . 7H_2O$ | 10 mg |
| Molibdat de amoniu $4H_2O$ | 2 mg |
| $Na_2B_4O_7$ | 2 mg |
| pH = 4,5 | |

Sursa optimă de N anorganic pentru producerea toxinei este sulfatul de amoniu. Înlocuirea cu surse complexe de N organic (casaminoacizi, extract de levuri, peptona) favorizează creşterea şi producţia optimă de aflatoxină, în absenţa asparaginei.

Calea de biosinteză constă din cel puţin 18 trepte enzimatice, care încep de la acetil-CoA. Aflatoxinele se sintetizează pe calea poliacetatului, asemănătoare sintezei acizilor graşi. S-a studiat rolul malonatului în sinteză. Scăderea pH şi adăugarea EDTA stimulează încorporarea malonatului, dar efectul asupra încorporării acetatului a fost mai puţin pronunţat. Malonatul este un intermediar al sintezei aflatoxinelor şi este încorporat fără conversia prealabilă la acetat. Intermediarii ciclului acizilor tricarboxilici stimulează încorporarea acetatului. Oxaloacetatul are efect stimulator maxim, urmat de acizii citric, malic, fumaric. Clorurile de mercur şi respectiv de bariu stimulează încorporarea acetatului. Zincul este un element esenţial pentru sinteza mai multor metaboliţi esenţiali. Acidul fitic, în cantităţi mari în seminţele de soia, este agent chelator al Zn, ceea ce explică incidenţa scăzută a contaminării cu aflatoxină. Autoclavarea seminţelor de soia degradează complexul acid fitic-Zn şi stimulează sinteza aflatoxinelor.

Scanned with OKEN Scanner

Aflatoxinele se sintetizează intracelular şi ulterior sunt excretate. Sunt puţin solubile în apă, dar sunt solubile în alcooli, solvenţi cloruraţi, benzen, acetonă, lipide.

Toate tulpinile care produc aflatoxinele grupului G, produc şi aflatoxinele grupului B.

Cea mai abundentă şi cea mai toxică este *aflatoxina* $B_1$ în timp ce $B_2$* are cea mai mică toxicitate dintre membri acestei familii de compuşi foarte toxici ($DL_{50}$ = 10–80 μg/kg).

*Molecula $B_2$ are doi centri stereogeni şi poate exista în 4 forme stereoizomerice (chirale). *Chiralitatea* este proprietatea a două corpuri de a se comporta ca un obiect şi imaginea sa în oglindă, adică cele două corpuri nu sunt direct superpozabile prin translaţie în acelaşi plan, ci numai după o rotaţie cu 180°.

Sinteza aflatoxinei de către *Aspergillus* este dependentă de concentraţiile $O_2$, $CO_2$, Zn şi Cu, precum şi de locaţia fizică: *A. fumigatus* şi *A. flavus* cresc în silozurile de tip tranşee, iar speciile de *Fusarium* cresc în silozurile verticale.

În mod obişnuit, *A. flavus* sintetizează aflatoxinele $B_1$ şi $B_2$, iar *A. parasiticus* sintetizează aflatoxinele $B_1$, $B_2$, $G_1$ şi $G_2$. Ordinea potenţialului toxic este $B_1 = M_1 > G_1 > B_2 > G_2$.

Expunerea la aflatoxine are un nivel ridicat în regiunile în care anumite produse alimentare sunt depozitate în condiţii improprii.

Aflatoxinele produc efecte toxice acute şi teratogene la om şi animale, leziuni hepatice acute, ciroză, sunt imunosupresoare, mutagene, carcinogene.

*Metabolizarea.* După ingestie, aflatoxinele sunt absorbite la nivelul duodenului sau după inhalare, la nivel pulmonar. În sânge, aflatoxinele se cuplează cu albumina şi pe calea venei porte ajung în ficat, unde prin difuzie pasivă pătrund în hepatocite şi se concentrează. În hepatocite sunt metabolizate şi rezultă *derivaţi hidroxilaţi*. Citocromul $P_{450}$ are rolul de oxidază terminală. Forma oxidată a hemoproteinei $P_{450}$ se leagă de substrat şi se reduce cu un $e^-$. Complexul redus enzimă-substrat se combină cu $O_2$ molecular. Adăugarea unui al II-lea $e^-$ are ca rezultat oxidarea substratului şi formarea apei. Aflatoxinele sunt convertite la forma de epoxizi-8,9, reactivi, care au proprietatea de a se lega cu proteinele şi cu ADN* (fig. 28).

*Teoria chimică a carcinogenezei presupune că agentul carcinogen reacţionează cu molecule critice ale celulei. Carcinogenii nu au un model structural comun, dar toţi sunt metabolizaţi la intermediari reactivi *electrofili*, sub acţiunea enzimelor din reticulul endoplasmic. Intermediarii electrofili se combină cu grupările *nucleofile* (bogate în electroni) ale proteinelor şi acizilor nucleici, prin legături covalente.

Neoplaziile se caracterizează prin absenţa controlului creşterii. Din această cauză, carcinogenul trebuie să interacţioneze cu macromoleculele ţintă implicate în controlul informaţional al creşterii, înainte ca procesul carcinogenic să poată fi iniţiat.

Deficienţa proteinelor din dietă diminuă potenţialul inducerii enzimelor, iar anumite lipide ale dietei influenţează decisiv nivelul inducerii aceloraşi enzime.

Mulţi agenţi chimici şi metaboliţi endogeni (hormoni steroizi, tiroxină, bilirubină) sunt modificaţi prin procese chimice catalizate de enzime localizate în reticulul endoplasmic al celulei. Una dintre primele reacţii constă în *oxigenarea* substratului. Echivalenţii reducători ai reacţiei sunt

Scanned with OKEN Scanner

furnizaţi în primul rând de NAD redus, dar aceiaşi moleculă poate furniza electroni. Citocromul $P_{450}$ are rolul de oxidază terminală. Forma oxidată a hemoproteinei $P_{450}$ se leagă de substrat şi se reduce cu un electron. Complexul redus enzimă-substrat se combină cu $O_2$ molecular. Adăugarea unui al II-lea electron are ca rezultat oxidarea substratului şi formarea apei.

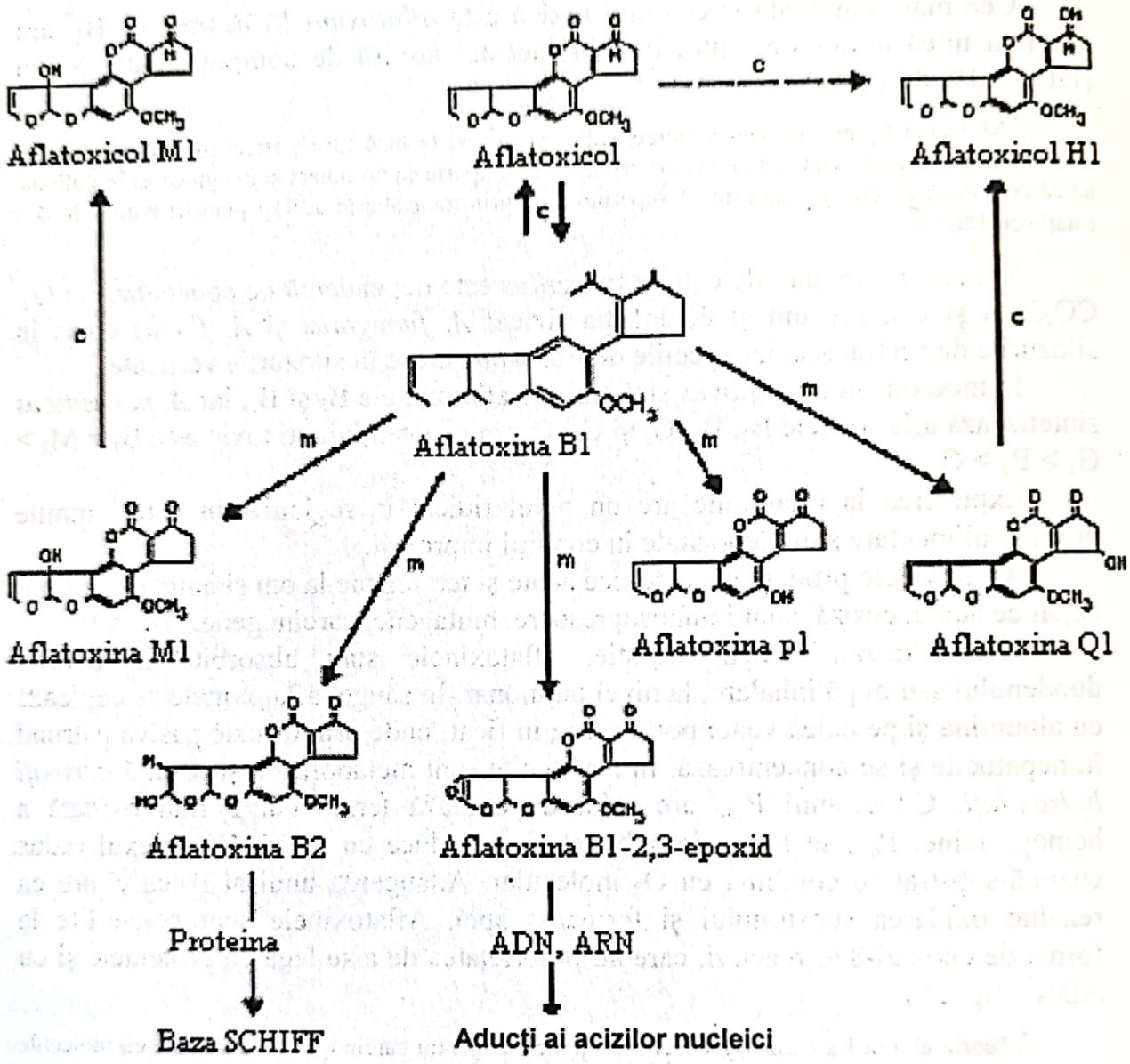



Fig. 28 – Calea degradării metabolice a aflatoxinei $B_1$ în ficat.

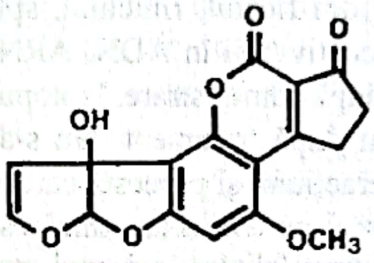
*In vitro*, $AFB_1$ poate fi biotransformată în preparatele acelulare din hepatocite, în câţiva metaboliţi, până la produsul final – 2,3 epoxid $AFB_1$. Epoxizii $AFB_1$ şi $AFB_2$ au fost consideraţi ca forme active ale $AFB_1$, care produc efectul toxic acut şi respectiv efectele carcinogene. Reductazele din fracţia citoplasmatică reduc $AFB_1$ la aflatoxicol, mai puţin toxic decât $AFB_1$, dar cu acţiune carcinogenă.

Studiul *metabolizării* aflatoxinei $B_1$ la animalele test a evidenţiat un metabolit hidroxilat fluorescent, denumit *aflatoxina* $M_1$. Aflatoxinele $M_1$ şi $M_2$ sunt

Scanned with OKEN Scanner

metaboliții hidroxilați ai aflatoxinei $B_1$ și se găsesc în laptele și în urina vacilor expuse consumului aflatoxinei $B_1$. Excreția aflatoxinei $M_1$ reprezintă 0,9% din cantitatea de aflatoxină ingerată. În cisternele reticulului endoplamic din hepatocite, aflatoxina $B_1$ este convertită în compusul $M_1$. Metabolitul hidroxilat fluorescent $M_1$ al aflatoxinei $B_1$ s-a identificat în secreția lactată, în urină și în conținutul intestinal.

Epoxizii reactivi ai aflatoxinei se leagă de $N^7$ al resturilor de guanină. Complexele ADN-aflatoxină $B_1$ induc apariția transversiilor GC la TA. Conjugatul aflatoxină $B_1$-$N^7$ guanină este un marker urinar sigur al expunerii recente a organismului la aflatoxină.




Aflatoxina $M_1$

A doua cale majoră de metabolizare este *conjugarea*. După conjugarea cu acidul glucuronic sau cu glutation, catalizată de o glutation-S-transferază citosolică și microsomală, derivații sunt eliminați. Variațiile cantitative ale glutation-transferazei, ca și ale sistemului de citocromi $P_{450}$, explică diferențele sensibilității speciilor de animale la aflatoxină. Circa 50% din cantitatea de aflatoxină este eliminată prin secreția biliară, iar 25% pe cale urinară.

Toxicitatea acută este foarte rară la om. Se citează cazul unei hepatite toxice acute în India, când 100 de oameni au murit datorită consumului porumbului contaminat cu aflatoxine. Doza letală pentru om este de 10–20 mg.

Ținta acțiunii aflatoxinei este ficatul. Datorită potențialului carcinogenic înalt și toxicității extreme asupra țesutului hepatic, concentrațiile chiar foarte mici de aflatoxine prezintă un risc major pentru sănătatea omului. În cantități mari, aflatoxina este letală, iar expunerea cronică la concentrații mici produce neoplazii, în special *carcinom hepatocelular* la multe specii de animale. Aflatoxina este cel mai puternic carcinogen hepatic pentru diferite specii, inclusiv pentru om.

Gradul toxicității este dependent de specie, vârstă etc. Toate animalele testate sunt sensibile în diferite grade la acțiunea toxinei. Cantitățile foarte mici de toxină ingerate odată cu hrana au produs leziuni în organele interne, în special în ficat. Animalele tinere (iepure, porc, rață) sunt foarte sensibile, calul, oaia, vițelul și curca au sensibilitate moderată, iar puiul de găină este relativ rezistent. Diferențele legate de specie reflectă probabil capacitatea de a forma derivați epoxizi în microsomii și în reticulul endoplasmic din hepatocite.

*Interacțiunea cu macromoleculele.* Aflatoxinele sunt singurele micotoxine care interacționează cu acizii nucleici. Studiile experimentale au adus dovezi certe

Scanned with OKEN Scanner

ale *interacţiunii aflatoxinelor cu ADN celular*. Astfel, adăugarea ADN la soluţia de aflatoxină $B_1$ la pH neutru a modificat maximul de absorbţie al toxinei de la 360 la 368 nm, cu o hipocromie la 355 nm şi hipercromie la 385 nm. Gradul interacţiunii cantitative a aflatoxinelor cu ADN are următoarea ordine: $B_1 > B_2 > M_2 > G_1 > > (G_2, B_{2a}, M_1$ şi $G_{2a})$. Interacţiunea aflatoxinelor cu ADN *in vitro* are semnificaţie discutabilă cu privire la mecanismul acţiunii, dar legarea lor cu acizii nucleici *in vivo* poate să explice efectul biologic major – inducerea neoplaziei. Mecanismul interacţiunii *in vivo* poate fi cu totul diferit de legarea *in vitro*. Utilizând aflatoxine tritiate $B_1$ şi $G_1$ s-a adus dovada directă a legării aflatoxinelor cu ADN, ARN şi cu fracţiile proteinelor solubile din ficatul, rinichiul, splina şi intestinul de şobolan. Încorporarea maximă a radioactivităţii în ADN, ARN şi proteine s-a evidenţiat în ficat, în intervalul 6–18 ore după administrare. Izotopul s-a detectat în constituienţii celulari până la 8 săptămâni după tratament. Nu s-a remarcat o corelare directă între nivelul cantitativ al interacţiunii şi procesul carcinogenic.

Unul dintre efectele majore ale aflatoxinei este *neoplazia*. Aflatoxina $B_1$ produsă de *A. flavus* este unul dintre cei mai puternici carcinogeni hepatici cunoscuţi, iar aflatoxina $G_1$ este inductoare mai eficientă decât $B_1$, a tumorilor renale experimentale.

Mulţi carcinogeni, *in vivo*, necesită activarea metabolică şi conversia lor în derivaţi reactivi, adică în reactanţi *electrofili*, înainte de a reacţiona cu moleculele *nucleofile* celulare. Efectul carcinogen al aflatoxinei $B_1$ se datorează bioconversiei într-un *epoxid electrofil* foarte reactiv faţă de ADN, ARN şi proteine, cu care formează legături covalente. Studiile epidemiologice arată o corelaţie pozitivă între ingestia aflatoxinei şi cancerul hepatic. Regiunile cu cea mai înaltă incidenţă a cancerului hepatic corespund zonelor care favorizează contaminarea rezervelor de hrană.

Natura interacţiunii aflatoxinelor cu *proteinele* este mai puţin cunoscută decât interacţiunea cu ADN. Metoda dializei la echilibru a arătat că fracţia histonică, bogată în lizină, poate lega aflatoxina $B_1$ şi induce modificări conformaţionale majore. Se consideră că legarea este covalentă şi probabil este rezultatul interacţiunii aflatoxinelor, în special $B_{2a}$, prin mecanisme asemănătoare cu cele prin care toxinele interacţionează cu acizii nucleici.

S-a studiat interacţiunea aflatoxinei $B_1$ cu compuşii care *donează electroni* (dimetilanilina, hexametilbenzen) şi cu aminoacizii. Aflatoxina $B_1$ s-a complexat cu compuşii donori de electroni (nucleofili) şi cu aminoacizii (triptofan, histidină), într-o reacţie cu transfer de sarcină, care sugerează că aflatoxina $B_1$ are rol de acceptor de electroni. Probabil acelaşi tip de interacţiune se produce *in vivo*, între aflatoxina $B_1$ şi macromolecule.

Triptofanul donează electroni şi în reacţia cu alte aflatoxine ($B_1$, $G_1$ şi $G_2$), dar la un nivel inferior.

Interacţiunea diferitelor aflatoxine cu DN-aza s-a demonstrat spectrofotometric. Unele aflatoxine ($B_1$, $G_1$ şi $B_2$) stimulează activitatea enzimatică a DN-azei, iar altele ($B_{2a}$, $G_{2a}$, $G_2$, $M_1$) o inhibă.

Scanned with OKEN Scanner

*Efectul carcinogen.* Aflatoxina $B_1$ are acţiune sinergică cu virusul hepatitei B (VHB) în mecanismul inducerii *carcinomului hepatocelular* (CHC) la om. Pentru cei care consumă alimente contaminate cu aflatoxina $B_1$, riscul CHC este de 3 ori mai mare, iar cei pozitivi pentru infecţia cu HBV prezintă un risc de 7 ori mai mare. Pentru indivizii infectaţi cu VHB şi expuşi consumului de alimente contaminate cu aflatoxina $B_1$, riscul CHC creşte de 60 de ori.

Alcaloizii pirolizidinici produşi de câteva specii de plante sunt hepatotoxici. Lasiocarpina (alcaloid pirolizidinic) nu influenţează incidenţa tumorilor hepatice induse de aflatoxină. *Lipidele* alimentare sunt recunoscute pentru rolul lor protector în aflatoxicoză. Creşterea conţinutului lipidic în hrana puilor de găină, de la 2 la 16%, a redus toxicitatea aflatoxinelor din furajele alimentare. Se presupune că lipidele alimentare împiedică absorbţia toxinelor din tractul gastrointestinal.

Activitatea carcinogenică a aflatoxinei $B_1$ este mediată, parţial, de proprietăţile mutagene ale unor derivaţi metabolici ai săi. Derivatul major al aflatoxinei $B_1$ - *formamidopirimidina* (FAPI) - foarte persistent şi foarte mutagen, cu efecte pe termen lung asupra integrităţii genetice a celulelor, produce leziuni foarte persistente ale ADN în ţesutul hepatic. Este un blocant puternic al replicării ADN. Derivatul metabolic produce mutaţii care apar la situsuri distincte de locul leziunii iniţiale.

Mecanismele carcinogenezei cu aflatoxine, probabil implică efectul *promotor*. Există dovada activării unor protooncogene (c-myc, c-ras, Ki-ras, N-ras) sub acţiunea aflatoxinei, ca şi cu privire la efectul mutagen asupra genei p53. În peste 50% dintre cazurile de CHC s-a detectat mutaţia punctiformă G - T la poziţia a III-a a codonului 249 a genei p53, o antioncogenă*, dar şi în hepatocitele umane tratate *in vitro* cu aflatoxina $B_1$. Este posibil ca această secvenţă specifică să fie o ţintă pentru mutaţiile produse de toxină şi constituie un marker al expunerii la aflatoxină.

* În concepţia modernă, unii carcinogeni chimici au rolul de iniţiatori ai malignizării. Efectul lor este desăvârşit de o altă clasă de agenţi chimici, denumiţi promotori. Iniţiatorii sunt carcinogeni care acţionează prin efectul lor mutagen, dar singuri, de obicei nu produc malignizarea deoarece mecanismele de reparare a AND sunt eficiente (acţionează rapid şi fără erori). Promotorii nu sunt mutageni, dar mimează efectele factorilor de creştere, deoarece stimulează diviziunea celulară şi expresia alterată a genelor. Pentru a fi eficient, promotorul trebuie să fie aplicat după iniţiator, în mod repetat, timp de săptămâni sau luni, iar iniţiatorul trebuie aplicat o singură dată. Cei mai cunoscuţi promotori sunt esterii fosforului.

Antioncogenele sunt gene inactivatoare ale protooncogenelor. Ele codifică *proteine supresoare ale protooncogenelor* celulare, al căror rol este menţinerea funcţiilor normale ale celulei. Gena p-53, supresoare a oncogenelor, poate fi inactivată prin inserţia unui provirus la ambele alele, prin combinarea unui eveniment de inserţie cu pierderea celeilalte alele prin deleţie sau prin evenimente mutaţionale.

Studiile prin metoda RMN (*r*ezonanţă *m*agnetică *n*ucleară) arată că FAPI stabilizează duplexul ADN prin creşterea interacţiunilor de stivuire între formamidopirimidina intercalată şi bazele învecinate.

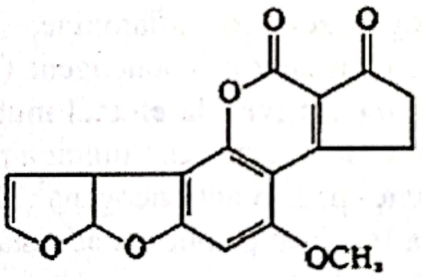
Scanned with OKEN Scanner

Aflatoxinele alterează *metabolismul lipidelor*. Afirmaţia se bazează pe creşterea conţinutului lipidelor în ficat la animalele intoxicate: porc, bovine, găină, curcă, raţă, şobolan, câine, pisică, cobai, maimuţă, om. După administrarea dozelor multiple subletale, aflatoxinele inhibă sinteza fosfolipidelor în ficatul de şobolan, dar lipidele se acumulează în celulele hepatice(ficatul gras). Compuşii lipotropi din dietă, reprezentaţi de metionină, vitamina $B_{12}$, acidul folic, colină, împiedică formarea ficatului gras. Oaia este foarte rezistentă la aflatoxine.

Metabolismul lipidelor este foarte important, deoarece, în funcţie de specie, o proporţie importantă a lipidelor (între 40–95% din total) se sintetizează în ficat şi de aici sunt transportate la situsurile de utilizare. De aceea, nivelul lipidelor hepatice este un indicator sensibil al perturbării metabolismului lipidic.

Există diferenţe mari ale sensibilităţii diferitelor specii la aflatoxină. Şobolanul este foarte sensibil, iar şoarecele foarte rezistent, datorită conjugării eficiente a aflatoxinei cu glutationul, catalizată de o glutation-transfrază.

*Sterigmatocistina* este precursorul aflatoxinelor, pe calea de biosinteză. Este produsă de câteva specii de fungi, *Aspergillus versicolor* fiind cea mai importantă. Toxicitatea orală este foarte mică, datorită solubilităţii foarte scăzute în apă şi în secreţiile digestive. Dozele administrate experimental pe cale orală sunt absorbite într-o măsură foarte mică şi ingestia este asimptomatică datorită insolubilităţii.




Sterigmatocistina

După administrare parenterală, este nefrotoxică şi hepatotoxică. Este considerată ca agent carcinogen.

Sterigmatocistina nativă are toxicitate moderată, dar devine carcinogenică după activarea în ficat sub acţiunea citocromului $P_{450}$. Este un factor inhibitor specific al mişcării cililor traheali.

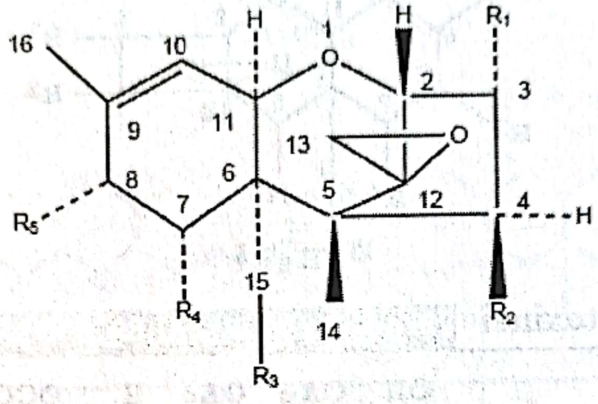
*Trichotecene*

*Trichotecenele* sunt o familie de 148 de toxine produse de *Fusarium, Trichoderma, Cephalosporium, Myrothecium, Stachybotrys* etc., care se dezvoltă pe seminţele de cereale. Sunt caracterizate prin structura *tetraciclică sesquiterpenoidă*, formată dintr-un inel oxanic, un grup *epoxi* la C12–13 şi o dublă legătură la C9-10. Pot fi considerate ca 12–13 epoxitrichotecene. Gruparea epoxi şi dubla legătură sunt importante pentru activitatea biologică. Pe nucleu se leagă diferite grupări: hidroxil, acetil sau grupări mai complexe, rezultând un număr mare de variante

Scanned with OKEN Scanner

moleculare, clasificate în *4 grupe* în funcţie de natura grupărilor funcţionale. Sunt foarte solubile în alcooli, eter etilic, propilen-glicol puţin solubile în apă. Nu emit fluorescenţă după excitare cu raze uv. Sunt stabile, se conservă prin depozitarea produselor contaminate şi rezistă la tratamentul termic, la radiaţiile UV sau în mediul alcalin.

Denumirea de „trichotecene" derivă de la *trichotecin*, unul dintre primii reprezentanţi toxici identificaţi ai familiei.




Modelul general al structurii trichotecenelor

Cele 148 trichotecene (83 sunt non-macrociclice, iar 65 sunt macrociclice) s-au izolat din culturile fungice şi din plantele infectate şi sunt împărţite în 4 grupe:

– *grupa A* este caracterizată printr-un grup funcţional, altul decât cetona, la C-8. Este grupa cea mai largă, care cuprinde toxina *T-2, DAS* (diacetoxiscirpenol) şi sunt produse de speciile de *Fusarium*: *F. tricinctum, F. sporotrichoides, F. poe, F. equiseti*;
– *grupa B* are o funcţie cetonă la C-8: *deoxynivalenol* (DON), *nivalenol* (NIV). Sunt produse de *F. graminearum* şi *F. culmorum*;
– *grupa C* cuprinde *trichotecenele macrociclice*. Moleculele au un grup secundar epoxid la C-7,8 sau C-9,10. Sunt sintetizate numai de câteva specii;
– *grupa D* cuprinde molecule cu inelul macrociclic între C-4 şi C-5, cu două legături esterice. Sunt produse de *Stachybotrys atra, Myrothecium*. Cea mai importantă specie producătoare este *Stachybotrys atra*.

Molecula trichotecenelor conţine numai C, H şi O.

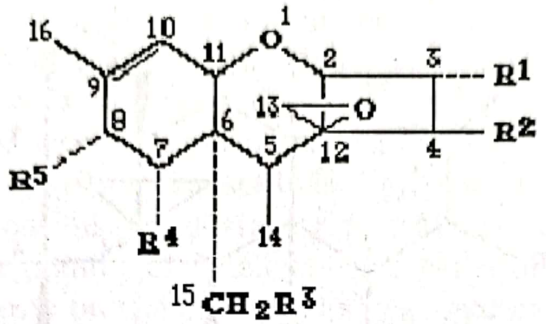
Trichotecenele purificate prin extracţie sunt substanţe solide, incolore, cristaline, optic active, moderat solubile în solvenţii organici polari şi solubile în apă. În stare solidă sunt compuşi stabili. În soluţie, la valorile extreme ale pH, moleculele intră în reacţie: esterii sunt saponificaţi după tratamentul cu baze, iar sub acţiunea acizilor minerali puternici, epoxidul 12–13 se deschide. Saponificarea nu are efect marcat asupra toxicităţii, dar deschiderea epoxidului 12–13 le anulează toxicitatea.

Sinteza trichotecenelor este influenţată de factori ecologici: umiditate, temperatură, nutrienţii din substrat. Unele specii sunt mai toxigene la temperaturi scăzute (4–8°).

Scanned with OKEN Scanner

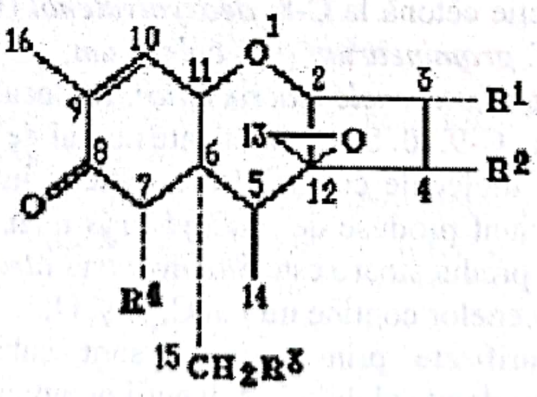
Trichotecenele sunt produse de o largă varietate de fungi : circa 20% dintre izolate produc aceste toxine. Fiecare specie produce mai mult decât o toxină din grupul trichotecenelor de exemplu *Fusarium tricinctum* produce toxina T-2, HT-2 şi diacetoxiscirpenol.

**Trichotecene de tip A**




| Denumirea toxinei | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | $R_5$ |
|---|---|---|---|---|---|
| T-2 | OH | OAc | OAc | H | $OCOCH_2CH(CH_3)_2$ |
| T-2 tetraol | OH | OH | OH | H | OH |
| HT-2 | OH | OH | OAc | H | $OCOCH_2CH(CH_3)_2$ |
| DAS (diacetocetoxiscirpenol) | OH | OAc | OAc | H | H |
| Neosolaniol | OH | OAc | OAc | H | OH |

**Trichotecene de tip B**

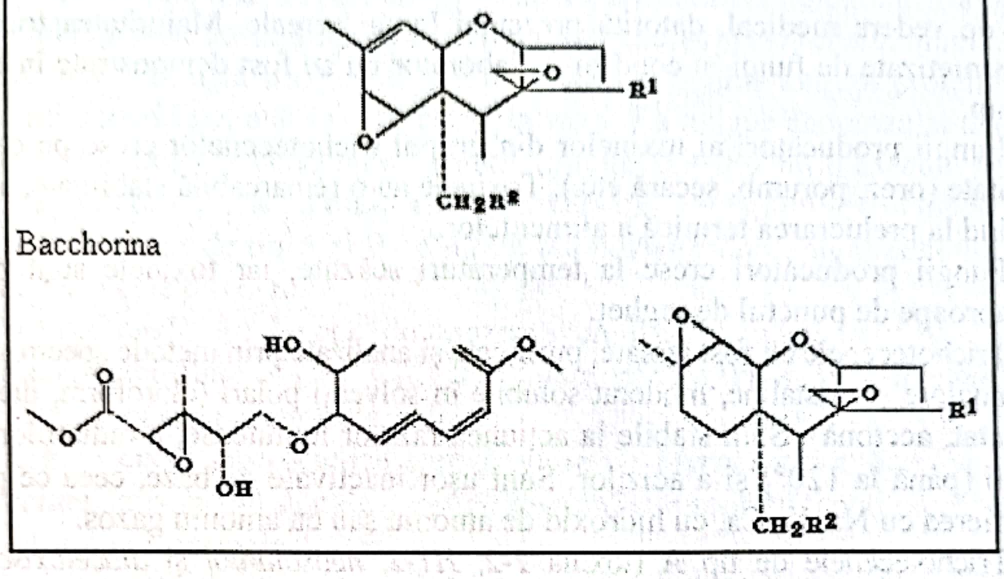



| Denumirea toxinei | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ |
|---|---|---|---|---|
| Deoxinivalenol | OH | H | OH | OH |
| Nivalenol | OH | OH | OH | OH |
| Trichocetin | H | $OCOCH=CHCH_3$ | H | H |
| Fusarenona-x | OH | OAc | OH | OH |

Scanned with OKEN Scanner

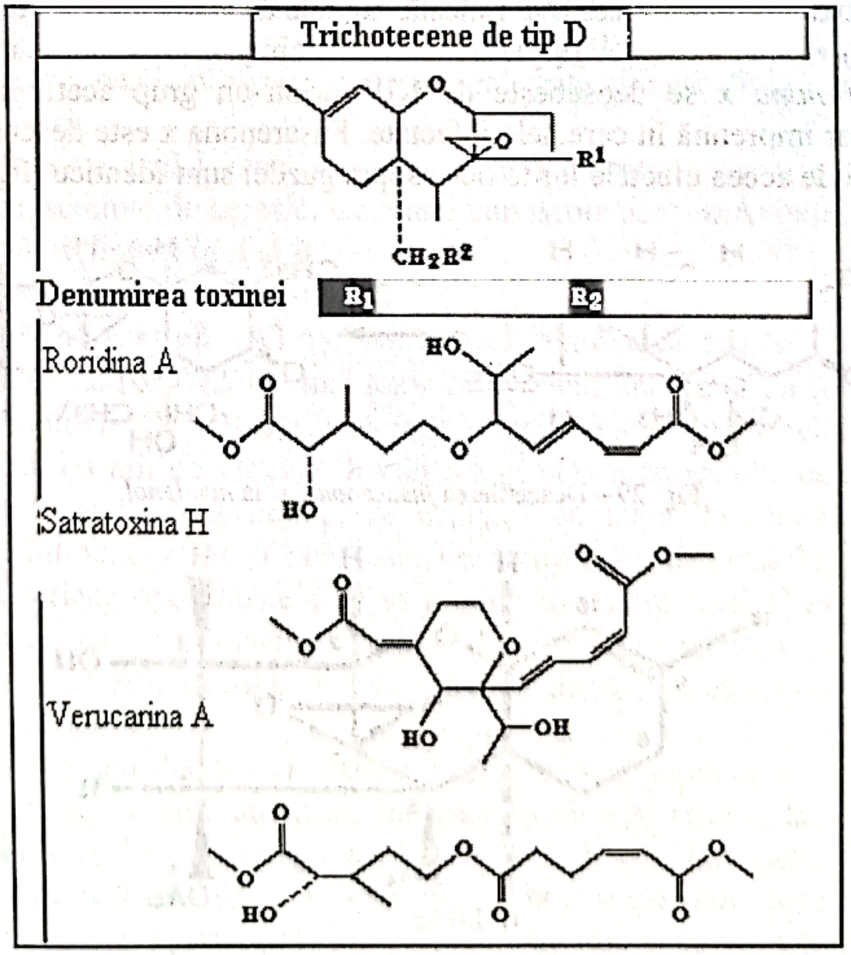
**Trichotecene de tip C**

| Denumirea toxinei | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| Crotocina | H | $-OCOCH=CHCH_3$ |
| Bacchorina | OH | $-OCOCH=CHCH_3$ |




**Trichotecene de tip D**

| Denumirea toxinei | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| Roridina A | OH | macrocicl |
| Satratoxina H | OH | macrocicl |
| Verucarina A | OH | macrocicl |




(din International Programe on Chemical Safety)

Verucarinele şi roridinele, izolate din culturile de *Myrothecium verrucaria* şi *M. roridum* sunt substanţe foarte toxice, cu acţiune citostatică. Prin hidroliză cu baze, ambele produc acelaşi alcool sesquiterpenic, dar prin hidroliză acidă produc compuşi diferiţi.

Puţine dintre trichotecenele cunoscute (toate de tip A şi B) sunt importante din punct de vedere medical, datorită prezenţei lor în cereale. Majoritatea trichotecenelor sintetizate de fungi în condiţii de laborator nu au fost demonstrate în condiţii de câmp.

Fungii producători ai toxinelor din grupul trichotecenelor cresc pe cerealele depozitate (orez, porumb, secară etc.). Toxinele au o remarcabilă stabilitate, adeseori rezistând la prelucrarea termică a alimentelor.

Fungii producători cresc la temperaturi scăzute, iar toxinele sunt produse chiar aproape de punctul de îngheţ.

Trichotecenele au fost izolate, purificate şi analizate prin metode spectroscopice. Sunt incolore şi cristaline, moderat solubile în solvenţi polari (cloroform, dietil-eter, etil-acetat, acetonă). Sunt stabile la acţiunea razelor luminoase, a radiaţiilor UV, a căldurii (până la 120°) şi a acizilor. Sunt uşor inactivate de baze, ceea ce permite detoxifierea cu Na, K, Ca, cu hidroxid de amoniu sau cu amoniu gazos.

Trichotecenele de tip A (toxina *T-2, HT-2, neosolaniol* şi *diacetoxiscirpenol* (DAS) au toxicitatea acută cea mai ridicată, iar cele de tip B (*deoxinivalenol* (DON = vomitoxina), *nivalenolul* (NIV) şi *fusarenona x* sunt implicate în intoxicaţiile cronice.

*Fusarenona x* se deosebeşte de NIV printr-un grup acetil la poziţia $C_4$. Ambele apar împreună în cerealele infectate. Fusarenona x este deacetilată rapid la nivalenol şi de aceea efectele lor toxice asupra gazdei sunt identice (fig. 29).

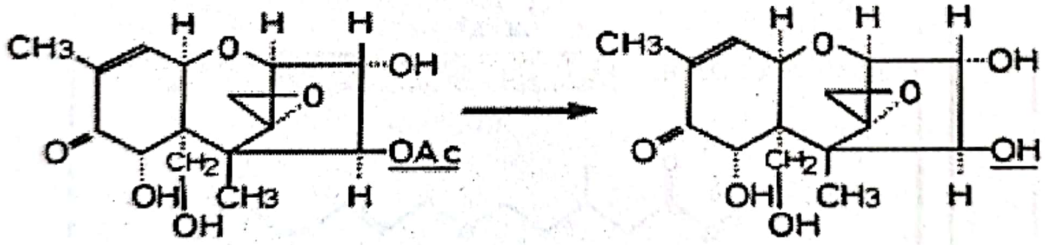
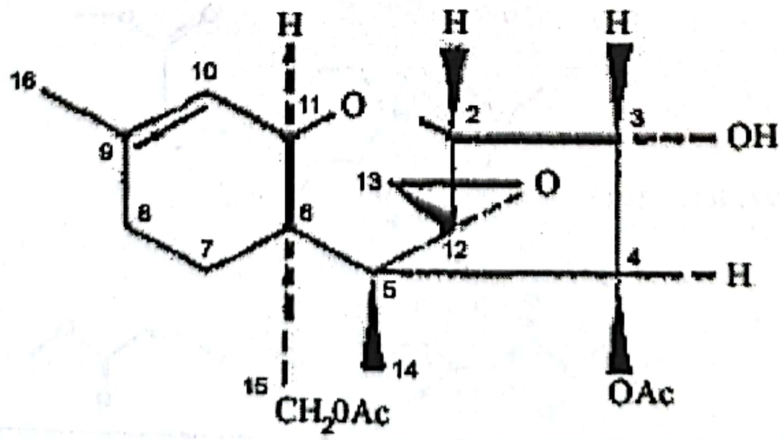



Fig. 29 – Deacetilarea *fusarenonei x* la *nivalenol.*




Diacetoxiscirpenol

Alte trichotecene macrociclice (satratoxinele şi verucarinele) se găsesc în furaje, dar nu s-au detectat în alimente.

Simptomele comune constau în leziuni ale mucoasei tractului gastrointestinal, hemoragii şi un răspuns inflamator general, toxicitate hematologică. Simptomul tipic acut al ingestiei dozelor mari de trichotecene este voma şi refuzul hranei.

Cea mai puternică trichotecenă – toxina T-2 – inhibă sinteza proteinelor şi funcţiile mitocondriale, atât *in vivo* cât şi *in vitro*. Ea induce apoptoza şi alterează funcţiile membranei la concentraţii cuprinse între 0,9–9,0 nM. Efectul poate fi contracarat prin co-incubarea toxinei cu antioxidanţi.

Trichotecenele de tip A şi B au efecte *imunosupresoare*, chiar la concentraţii mai mici decât cele din cereale.

Trichotecenele, în funcţie de prezenţa unui ester macrociclic sau a unei legături eter-ester între $C_4$ şi $C_{15}$, sunt *macrociclice* şi *nemacrociclice*. Cele nemacrociclice aparţin grupului A şi B.

Trichotecenele macrociclice sunt produse de *Myrothecium, Stachybotrys* şi *Trichotecium*, într-un amestec denumit *glutinozină* cu proprietăţi antimicrobiene, în care se găsesc verucarinele A şi B.

Toxicitatea trichotecenelor se datorează grupării *epoxid*. Prin hidrogenare catalitică ciclul se deschide şi rezultă dioli netoxici. Sunt toxice pentru om şi alte mamifere, păsări, peşti, o varietate de nevertebrate, plante (în general, pentru celulele eucariote).

Toxinele s-au izolat dintr-o varietate de substraturi: materie vegetală în descompunere, seminţe de cereale. Cele mai cunoscute sunt *satratoxinele F, G, H, verucarina J* şi *trichoverolii A* şi *B*.

Trichotecenele sunt inductoare ale unui tip de leucopenie severă la om – *aleukia toxică alimentară* (ATA). Amestecul toxic este foarte complex, dar totdeauna conţine toxina T-2, cel mai toxic component. Intoxicaţia a fost semnalată la începutul secolului XX în Rusia şi s-a repetat înaintea şi în timpul celui de-al II-lea război mondial, cu mii de victime. Iniţial s-a produs ulcerarea mucoasei orale şi gastroenterită, urmată de pancitopenie asociată cu stare de oboseală, vertigo, hipotensiune. Intoxicaţia are o rată mare de mortalitate, datorată în primul rând infecţiilor bacteriene oportuniste care se produc în stadiul final al intoxicaţiei. O treime dintre cei care au consumat cereale contaminate s-au intoxicat, iar dintre aceştia 1/3 au murit. Amestecul toxic este complex, dar totdeauna conţine toxina T-2, cel mai toxic component.

Pătrunderea sporilor toxici odată cu aerul inhalat produce un tablou clinic diferit şi cu intensitate mult atenuată, deoarece sporii sunt reţinuţi la nivelul căilor superioare. În alveole pot ajunge particule de 2–4 μm, iar sporii fungilor au dimensiuni de peste 7 μm. Sporii produc efecte alergice ale căilor respiratorii, de la inflamaţia căilor superioare (rinită cu conjunctivită), până la astm. Sporii de *Aspergillus* produc o aspergiloză pulmonară alergică.

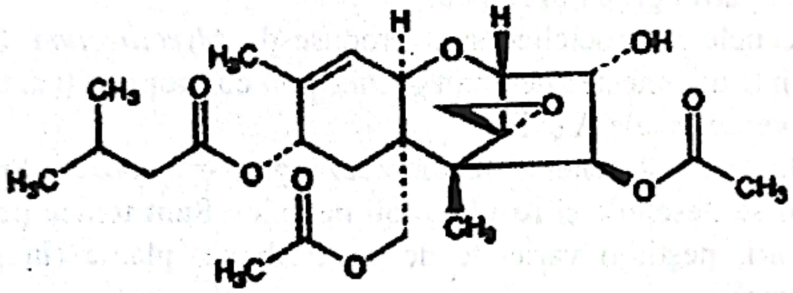
Scanned with OKEN Scanner

*Trichotecena T-2*, una dintre cele mai cunoscute toxine, este cea mai toxică dintre toxinele grupului, cu efecte letale. Se distinge de toxina HT-2 printr-un grup acetil la poziţia C4. Ambele apar simultan în cerealele infectate.

*HT-2* este metabolitul major al toxinei T-2, care se formează rapid prin deacetilare după expunerea organismului la toxina T-2. De aceea, efectele toxice ale celor două toxine *in vivo* nu se pot deosebi.

Toxina T-2 este produsă de fungii din genul *Fusarium* şi produce simptome grave la om: imunodeficienţă, necroză, edem al cavităţii bucale şi al regiunii gâtului (în forma gravă edemul produce asfixia), leziuni tegumentare, simptome ale SNC, hemoragii ale cavităţilor.

În doze mari toxina T-2 produce leziuni majore ale întregului tract digestiv şi hemoragii interne incompatibile cu supravieţuirea. În doze subletale produce ATA (aleukie toxică acută), hemosideroză pulmonară. Frecvent, leziunile sunt ireversibile.




Toxina T-2

În anii 1970–'80 micotoxina T-2 se crede că a fost folosită ca armă biologică, în incidentele cunoscute ca „ploaia galbenă" în Asia de sud-est, putând fi eliberată sub diferite forme de condiţionare: pulberi, picături, aerosoli. Spre deosebire de toxinele biologice care nu lezează tegumentul, toxina T-2 este un *iritant* puternic pentru suprafeţele neprotejate (tegument, conjunctiva oculară). Dozele mici produc iritaţie severă tegumentară şi oculară. Durerea datorată expunerii apare într-un interval de ordinul secundelor sau al minutelor, iar dozele mari sunt mortale în minute sau ore. Toxina T-2 este de circa 400 de ori mai eficientă comparativ cu alţi agenţi vezicanţi (gazul mustard).

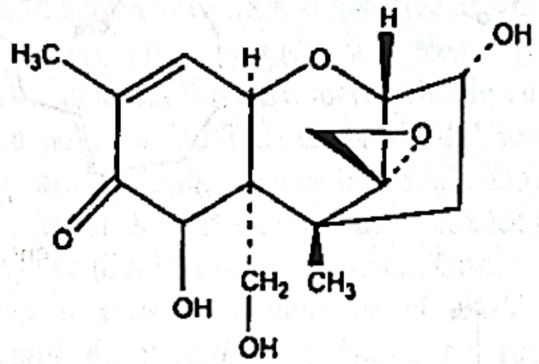
Toxina T-2 este toxică după inhalare, dar letalitatea e mai mare după contactul tegumentar, fiind din acest motiv consideraţi ca *agenţi vezicanţi*. Toxina inhalată produce durere nazală şi a regiunii gâtului, secreţie nazală, prurit şi strănut, tuse, scurtarea respiraţiei, hemoragie pulmonară. Intoxicaţia severă produce prostraţie, mişcări spasmodice, colaps, şoc şi moarte. Nu există chimioterapie, vaccin sau antidot specific.

*Deoxinivalenolul* (DON - vomitoxina) este toxina cea mai comună, dar are toxicitatea cea mai scăzută. Efectul său cel mai evident este refuzul hranei. Toxina este rezistentă la temperatura de panificaţie. DON este produs de *Fusarium graminearum*, pe seminţele de porumb, ingredientul major al hranei porcinelor.

Scanned with OKEN Scanner

Contaminarea are loc înainte sau după recoltare şi influenţează valoarea nutriţională a porumbului. Porumbul contaminat este refuzat de animale (datorită unui „factor de refuz"), dacă mai mult de 5% dintre seminţe conţin toxină. Animalele se înfometează, dar nu-l consumă. « Factorul de refuz » este un produs emetic, în fapt toxina *deoxynivalenol* sau *vomitoxină*. Toxina este stabilă mult timp în substrat, stabilitate argumentată de refuzul hranei. Sunt multe motive ale refuzului hranei şi de aceea singura cale pentru detectarea toxinei este izolarea, purificarea şi identificarea prin metode analitice.

DON nu este atât de toxic ca alte trichotecene, dar e foarte stabil pe timpul depozitării şi prelucrării alimentelor şi nu este degradat la temperatura de prelucrare a alimentelor. Toxina a fost asociată cu sindromul gastrointestinal acut la om. Efectul major constă în inhibarea granulocito- şi monocitopoezei. FDA a stabilit o limită maximă în alimente, de 1 ppm.




Deoxinivalenol (Vomitoxina)

După tratamentul cu o bază, trichotecenele care au un grup ester sunt hidrolizate la alcoolul parental. Sunt molecule stabile: de exemplu, DON poate fi păstrat în solvenţi organici (etil-acetat), fără deteriorare semnificativă.

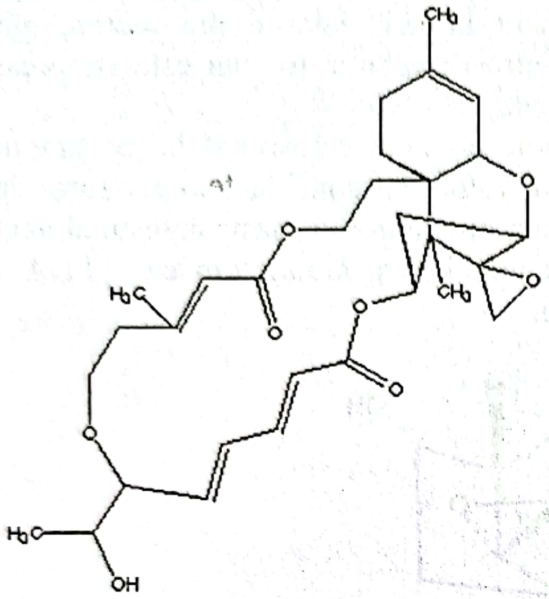
*Stachybotrys chartarum* (*Stachybotrys atra*) izolat din materiale celulozice (lucernă, paie) este agentul etiologic al *stachibotriotoxicozei*, o maladie severă a animalelor mari domestice, mediată de *trichotecene macrociclice*. Speciile de *Stachybotrys* pot produce spirolactami şi spirolactone, ciclosporine etc.

*S. chartarum* produce cele mai frecvente micotoxicoze cu trichotecene. Circa 2/3 dintre izolatele de *Stachybotrys* produc stachibotriotoxină. Nivelul concentraţiei trichotecenelor macrociclice sintetizate *in vitro*, nu pare suficient pentru a produce efectele toxice ample observate la animale, dar *in vivo*, efectele toxice sunt amplificate de derivaţii toxici ai moleculei native.

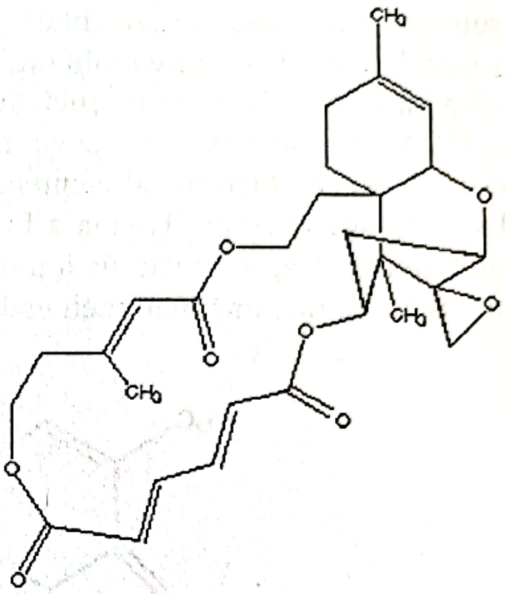
Trichotecenele sunt asociate cu sporii fungilor. Ele sunt exportate la suprafaţa sporului, unde devin solubile în apă, deoarece sunt incluse în polizaharidul solubil. Este posibil ca fungii toxigenici să exporte produsele toxice la suprafaţa celulei, unde inhibă dezvoltarea altor organisme, având semnificaţia unor molecule de antibioză interspecifică.

Scanned with OKEN Scanner

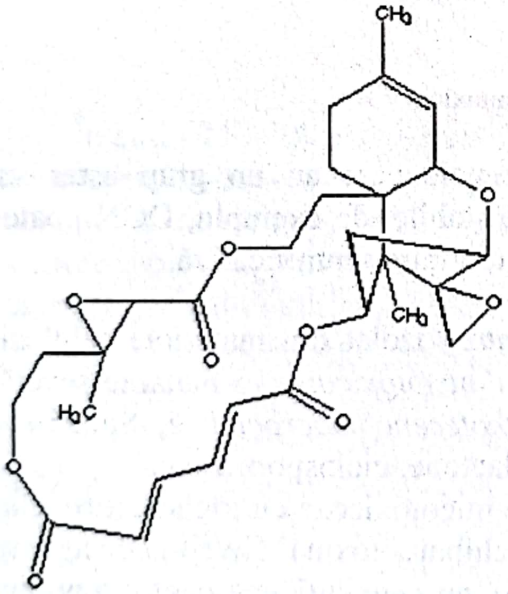
Densitatea mare a sporilor de *Stachybotrys atra* produce simptome nespecifice: frisoane, tulburări digestive, dureri de cap, dermatită, o stare de rău general. Analiza chimică a confirmat prezenţa trichotecenelor macrociclice: verucarina B, J, satratoxina, trichoverinele.



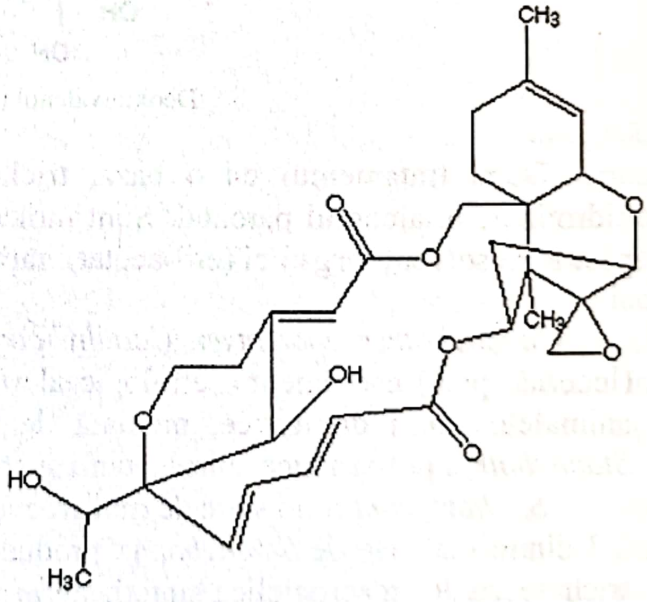
Roridina E



Verucarina J



Verucarina B



Satratoxina H

*S. chartarum* produce câteva micotoxine din categoria *trichotecenelor* macrociclice: *stachibotriotoxina, verucarina, roridina* şi *satratoxina.* Trichotecenele ca grup sunt foarte toxice şi, la animalele de experienţă, produc manifestări asemănătoare cu cele observate în stachibotriotoxicoză. De aceea, trichotecenele sunt considerate ca agenţi chimici producători ai maladiei.

Stachibotriotoxicoza, asociată cu consumul furajelor contaminate, se caracterizează prin leucopenie, hemoragie, aritmie cardiacă şi adeseori evoluează letal. Se apreciază că agenţii biologici nepatogeni, care periclitează starea de sănătate în clădirile umede, sunt fungii, datorită potenţialului alergic al sporilor inhalaţi odată cu aerul, iar pentru indivizii imunodeficitari, fungii sunt patogeni. Există dovezi care arată că efectele adverse pentru starea de sănătate consecutive inhalării sporilor au cauze multiple. Micotoxinele cu moleculă mică sunt factori patogeni importanţi asociaţi cu anumiţi fungi (*S. chartarum, Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Penicillium*). Şoarecii cărora li s-au administrat intranazal spori toxici de *S. chartarum*, au murit rapid, spre deosebire de cei care au primit aceiaşi doză de spori necitotoxici.

*Satratoxina H* este o trichotecenă macrociclică produsă de *S. chartarum, Trichoderma viridis* etc. Dozele mari sau cele cronice acute sunt letale. Produce avort la animale, alterează starea imunitară şi favorizează infecţiile oportuniste.

*Mecanismul de acţiune.* Trichotecenele sunt toxice pentru mamifere, păsări, peşti, nevertebrate, plante, în general pentru toate celulele eucariote. Trichotecenele sunt absorbite rapid. La porc, toxina T-2, DON şi NIV se găsesc în sânge în mai puţin de o jumătate de oră după expunerea la toxină. După ce sunt absorbite în circulaţia sistemică, indiferent de calea de pătrundere, efectele toxice se manifestă rapid faţă de celulele care se divid cu o rată crescută. Citotoxicitatea s-a evaluat prin determinarea cantitativă a *sintezei proteinelor* şi *ADN* prin metoda marcării radioactive şi prin testul de *viabilitate celulară* cu roşu neutru. Studiile cu trichotecene marcate sugerează că aceste molecule mici se deplasează liber prin membrană în ambele sensuri şi interacţionează cu grupările sulfhidrilice (-SH) ale proteinelor tisulare. Sunt *inhibitori foarte puternici ai sintezei proteice* în celulele eucariote (protozoare, celulele HeLa, hepatocite de şobolan, celule ovariene de hamster etc.) şi interferă cu fazele de iniţiere, alungire şi terminare ale procesului, datorită afinităţii lor de legare cu situsul activ al *peptidil-transferazei ribosomale.* Inhibiţia este competitivă, deoarece toxinele par să se lege de acelaşi situs ribosomal ca şi peptidil-transferaza şi survine la 5 minute după expunerea celulelor Vero la toxina T-2, cu un maxim la 60 de minute. Dezintegrarea polisomilor este efectul detectabil la microscopul electronic. În celulele HeLa, sinteza ARN este inhibată în proporţie de 86%. Trichotecenele inhibă sinteza ADN şi ARN, la concentraţii asemănătoare sau mai mari decât cele necesare pentru inhibiţia sintezei proteinelor. Mecanismul inhibiţiei sintezei ARN şi ADN nu se cunoaşte, dar poate fi efectul secundar al inhibiţiei sintezei proteinelor sau al efectului apoptotic al acestor toxine. Inhibiţia sintezei ADN şi ARN necesită concentraţii mai mari de trichotecene decât cele necesare pentru sinteza proteinelor şi gradul inhibiţiei este mult mai scăzut. Grupul trichotecenelor inhibă sinteza proteinelor, dar intensitatea efectelor variază în funcţie de toxină şi de sistemul celular utilizat pentru evaluarea efectului inhibitor. Trichotecenele nu inhibă creşterea celulelor bacteriene.

Scanned with OKEN Scanner

Unele trichotecene alterează activitatea serotoninei în SNC, implicată în reglarea ingestiei hranei. S-a determinat că DON inhibă motilitatea intestinului subţire la rozătoare, efect mediat prin receptorii intestinali pentru serotonină.

Datorită potenţialului de a influenţa sinteza proteinelor, toxinele acestui grup produc alte maladii care maschează toxicoza. Din această cauză au fost formulate multe diagnoze, înainte ca ATA să fie corect asociată cu toxinele de *Fusarium*.

Trichotecenele sunt molecule *amfifile*. Toxina T-2 exercită efecte multiple asupra membranei celulare: se intensifică *peroxidarea lipidelor* în ficat, splină, rinichi, timus, după administrarea orală a toxinei. Trichotecenele alterează structura membranei, ceea ce stimulează peroxidarea lipidelor. După ce traversează membrana, trichotecenele interacţionează cu diferite ţinte: ribosomi, mitocondrii. Aceste toxine inhibă catena transportoare de electroni, activitatea succinat-dehidrogenazei şi sinteza proteinelor mitocondriale.

Trichotecenele citotoxice (T-2) sunt foarte active faţă de celulele care se divid cu o rată crescută: celulele epiteliale ale criptelor intestinale, pe care le necrozează şi celulele ţesutului limfoid şi hematopoetic, după expunerea orală, parenterală sau după inhalare. Toxicoza severă poate produce pancitopenie.

Natura lipofilă a acestor toxine sugerează că sunt uşor absorbite prin tegument, intestin, epiteliul tractului respirator. Animalele de laborator mor în 1–2 ore după expunerea la aerosolii cu trichotecene.

*Citotoxicitatea* trichotecenelor se manifestă atât *in vivo* cât şi *in vitro*, în primul rând faţă de celulele cu o rată crescută a diviziunii: celulele epiteliale ale mucoasei tractului digestiv, celulele organelor hematopoetice şi organelor limfoide (splină, timus, ganglioni limfatici). Toxicitatea digestivă este consecinţa contactului direct cu celulele epiteliale ale tractului digestiv, demonstrată experimental prin apariţia leziunilor necrotice după contactul cu celulele epiteliului tegumentar. Trichotecenele produc o iritaţie severă şi inflamaţie la contactul cu tegumentul uman sau animal.

Efectele radiomimetice includ *necroza* celulelor care se divid activ în timus, splină, ovare, testicule, ganglionii limfatici. Necroza survine ca rezultat al inhibiţiei sintezei proteinelor şi este dependentă de doză.

Trichotecenele sunt inhibitori puternici ai *sintezei proteinelor* în celulele eucariote. Celulele HeLa sunt de circa 10 ori mai sensibile decât celulele de *Saccharomyces cerevisiae*. La concentraţii mari, trichotecenele inhibă sinteza acizilor nucleici (ADN şi ARN).

Iniţierea sintezei proteinelor este un proces complex care implică câţiva factori de iniţiere şi peptidil-transferaza (ca parte integrantă a subunităţii ribosomale 60 S), pentru formarea legăturii peptidice. După iniţiere, ribosomii suferă 100–200 evenimente de alungire a catenei polipeptidice, pe măsură ce aminoacizii sunt adăugaţi. În final, ca răspuns la codonul terminal, catena polipeptidică este eliberată de ribosom, iar ribosomul este eliberat din ARNm.

Scanned with OKEN Scanner

Terminarea necesită un factor de eliberare. Inhibitorii inițierii sintezei blochează intrarea noilor subunități polisomale și ribosomii, după ce și-au completat ciclul de sinteză, trec în rezerva celulară ca subunități. Astfel, inhibitorii inițierii convertesc rapid polisomii la monosomi și subunități ribosomale. Inhibitorii alungirii sau terminării catenei nu produc conversia la monosomi, ci blochează refacerea polisomilor pentru că acțiunea lor începe imediat după inițierea sintezei, dar permit polisomilor să se reformeze rapid.

Toate speciile de animale sunt sensibile la acțiunea trichotecenelor, dar severitatea intoxicației depinde de tipul de toxină (A sau B), de intensitatea și durata expunerii, de specie. Speciile monogastrice (suinele), precum și organismul uman sunt foarte sensibile. Intoxicația cu vomitoxină (DON) la porc, produce anorexie, cu scăderea semnificativă a greutății corporale și efect emetic.

Din punct de vedere clinic, trichotecenele produc hemoragie, edem, imunodeficiență, vomă, refuzul hranei, pierderea în greutate. În studii experimentale de toxicitate acută s-a observat acțiunea sinergică a aflatoxinelor $B_1$ și $T_2$.

Trichotecenele sunt rapid excretate din organismul animal, fără acumulare în țesuturi. La 24 h după administrarea orală sau intravenoasă, se găsesc numai în cantități urmă. Calea principală de excreție după injectarea intravenoasă este cea urinară, dar după expunerea orală, o proporție semnificativă este excretată pe cale digestivă. Toxinele reziduale în produsele de origine animală nu prezintă riscuri pentru periclitarea sănătății.

Trichotecenele nu au efect mutagenic. Nu lezează ADN, deoarece nu interacționează cu această moleculă.

Efectul *imunosupresor* se datorează inhibiției sintezei proteinelor, dar în special citotoxicității la nivelul organelor hematopoetice.

Acidul ascorbic, α-tocoferolul și seleniul sunt substanțe protectoare față de radicalii liberi și inhibă formarea acestora sub acțiunea trichotecenelor.

*Studiile metabolice* s-au făcut la animalele cărora li s-a administrat toxina T-2 și în mică măsură, DON. Ingestia furajelor contaminate cu fungii producători este principala cale de expunere la trichotecene. Toxinele se distribuie uniform în organism, fără acumulare în organe sau țesuturi specifice. Pentru a-și exercita activitatea biologică, trichotecenele nu necesită activarea metabolică. După aplicarea tegumentară, produc iritarea rapidă a tegumentului, iar după ingestie, irită mucoasa intestinală. Toxina inhalată trece în circulația sanguină și produce efecte sistemice. Natura lipofilă a acestor toxine sugerează că sunt ușor absorbite prin tegument, intestin și la nivel pulmonar.

Trichotecenele absorbite la nivelul intestinului ajung în ficat unde sunt transformate în metaboliți mai puțin toxici, prin următoarele tipuri de reacții:

- *reacții de hidroliză* (prin care se elimină grupările laterale);
- *hidroxilare;*
- *de-epooxidare* sub acțiunea unei *epoxid-transferaze;*
- *glucuronidare.*

Scanned with OKEN Scanner

Grupările *hidroxil* sunt uşor acetilate, iar moleculele *acetilate* sunt metabolizate rapid la forma *deacetilată* a toxinei (de exemplu, toxina T-2 este deacetilată la toxina HT-2; fusarenona-x, la DON; 3-acetil DON, la DON). Reacţiile de deacetilare sunt rapide şi sunt catalizate de *esteraze* nespecifice. O carboxil-esterază nespecifică din ficat hidrolizează selectiv grupul acetil $C_4$ al toxinei T-2 şi se formează HT-2, mai puţin toxică. Activitatea carboxil-esterazică specifică trichotecenelor s-a detectat în rinichi, creier, splină, intestin, leucocite şi eritrocite, ceea ce sugerează importanţa carboxil-esterazei în reacţia de detoxifiere a trichotecenelor.

*Reducerea inelului epoxid* este catalizată de microorganisme anaerobe ale tractului gastrointestinal. Prin de-epooxidarea trichotecenelor (adică îndepărtarea oxigenului din inelul epoxid la poziţia C 12-13, formându-se legătura dublă C=C) rezultă metaboliţi deepoxi, în esenţă netoxici. Reducerea epoxidului este o reacţie de detoxifiere care se produce într-o singură treaptă. Reacţia s-a produs după incubarea lor cu microbiota intestinală a diferitelor specii şi cu microorganisme din rumenul bovinelor. Cantităţi mici ale metaboliţilor rezultaţi din de-epooxidarea trichotecenelor s-au detectat în plasma şi în urina bovinelor şi ovinelor. T-2 şi DON sunt eliminate rapid pe cale digestivă şi urinară, într-un interval de ordinul orelor.

Unele trichotecene (DAS, T-2 şi HT-2) şi metaboliţii lor formează *conjugate* cu glutationul. Conjugatele glucuronidice reprezintă 63% din totalul derivaţilor metabolici şi sunt netoxici. La speciile monogastrice, conjugarea este absentă sau minimă.

O cantitate foarte mică de toxină este eliminată în formă nemodificată.

Omul se expune acţiunii trichotecenelor prin ingestia alimentelor vegetale. Alte căi de expunere sunt contactul tegumentar (la cei care le studiază) sau inhalarea prafului cu toxine. Consumul pâinii contaminate produce simptome gastrointestinale, iritarea mucoasei bucofaringiene, care apar după 15 minute.

Trichotecenele sunt inactivate prin conjugare cu *acidul glucuronic*.

Aparatul enzimatic care metabolizează trichotecenele se găseşte în numeroase tipuri de celule, dar organul major al metabolizării este ficatul. Detoxifierea este rezultatul biotransformării extensive şi rapide.

Majoritatea produselor excretate sunt fie metaboliţi, fie conjugaţi glucuronidici ai metaboliţilor. Indiferent de calea de administrare, trichotecenele sunt metabolizate şi eliminate rapid prin urină şi pe cale digestivă. Metaboliţii deacetilaţi şi hidroxilaţi se găsesc la majoritatea speciilor analizate (fig. 30).

Conjugatele glucuronidice reprezintă 63% dintre derivaţii metabolici şi sunt netoxici. O cantitate foarte mică de toxină este eliminată în formă intactă.

*Manifestări clinice*. Intensitatea manifestărilor clinice la omul expus acţiunii trichotecenelor este influenţată de starea nutriţională, de starea funcţională a ficatului, de eventualele infecţii intestinale, de calea de pătrundere etc. Efectele

Scanned with OKEN Scanner

toxice sunt aceleaşi, indiferent de calea de administrare. După ce sunt absorbite şi ajung în circulaţia generală, acţionează rapid asupra celulelor care proliferează intens.

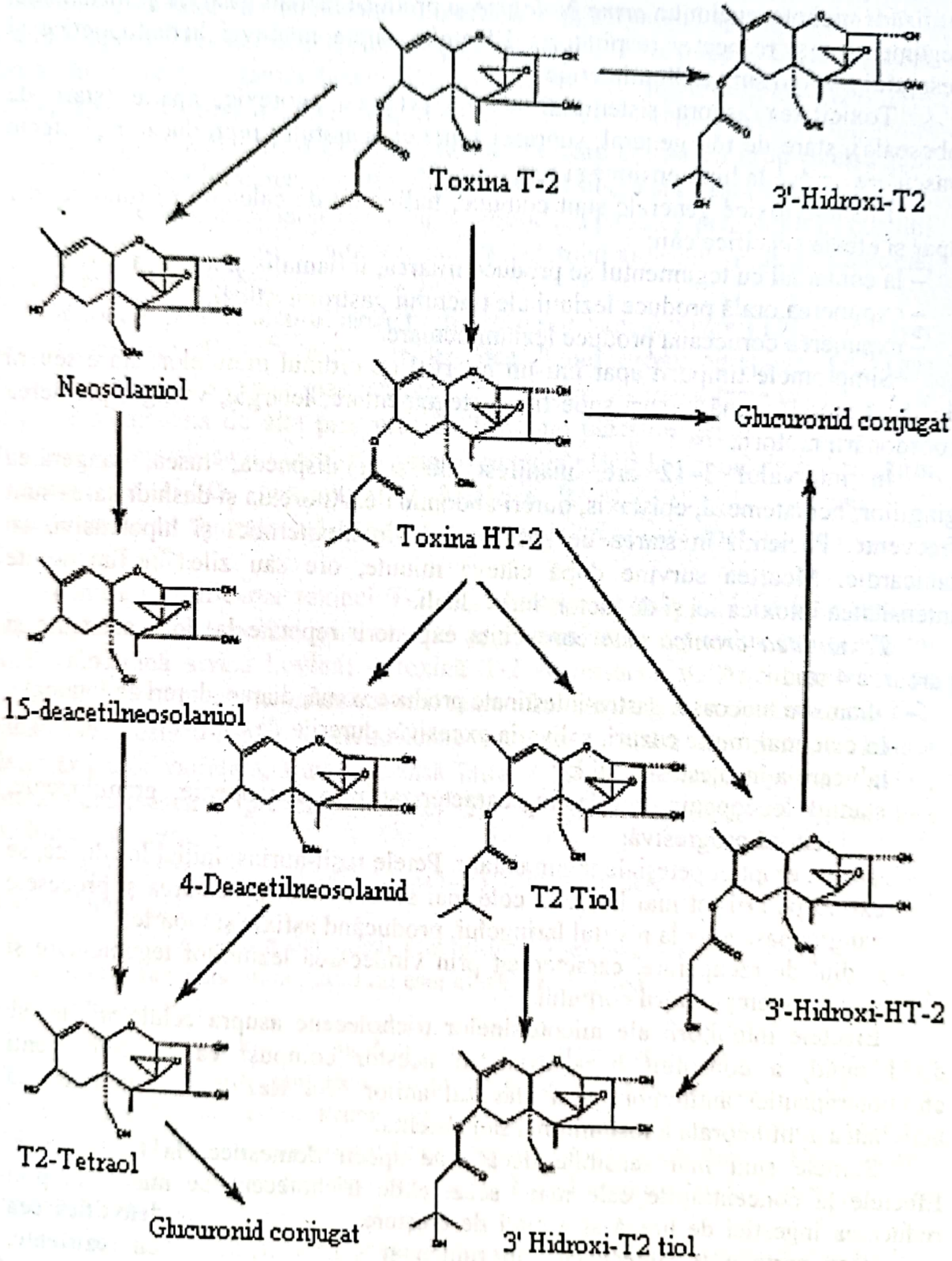



Fig. 30 – Calea metabolică a inactivării trichotecenelor.

Scanned with OKEN Scanner

Simptomele şi manifestările clinice ale intoxicaţiei cu trichotecene variază în funcţie de tipul de expunere: *acută* sau *cronică*.

*Expunerea acută* orală, parenterală, dermică sau prin aerosoli se datorează utilizării trichotecenelor ca *arme biologice* şi produce leziuni gastrice şi intestinale, tegumentare şi respectiv respiratorii. Efectele asupra măduvei hematopoetice şi ţesutului limfoid sunt radiomimetice.

Toxicitatea asupra sistemului nervos produce anorexie, apatie (stare de oboseală), stare de rău general, supresia funcţiei aparatului reproducător şi efecte vasculare ce duc la hipotensiune şi şoc.

Efectele toxice generale sunt comune, indiferent de calea de pătrundere, dar apar şi efecte specifice căii:

– la contactul cu tegumentul se produce iritarea, inflamaţia şi necroza tisulară;
– expunerea orală produce leziuni ale tractului gastrointestinal;
– expunerea corneeană produce leziuni oculare.

Simptomele timpurii apar într-un interval de ordinul minutelor: stare severă de rău general, vomă, arsuri superficiale tegumentare, letargie, vertigo, pierderea coordonării motorii.

În intervalul 3–12 ore, manifestările sunt dispneea, tusea, sângerarea gingiilor, hematemeză, epistaxis, dureri abdominale. Anorexia şi deshidratarea sunt frecvente. Pacienţii în starea de şoc final devin hipotermici şi hipotensivi, cu tahicardie. Moartea survine după câteva minute, ore sau zile, în funcţie de intensitatea intoxicaţiei şi de factori individuali.

*Toxicitatea cronică* este consecinţa expunerii repetate la doze subacute şi parcurge 4 stadii:

– inflamaţia mucoasei gastro-intestinale produce vomă, diaree, dureri abdominale. În cele mai multe cazuri, salivaţia excesivă, durerile de cap, vertijul, apatia şi tahicardia însoţesc stadiul I;
– stadiul leucopenic sau latent, caracterizat prin leucopenie, granulopenie, limfocitoză progresivă;
– apariţia erupţiei peteşiale tegumentare. Petele roşii-aprins, iniţial localizate, se extind pe arii tot mai largi. În cele mai severe cazuri, ulcerarea şi procesele gangrenoase apar la nivelul laringelui, producând asfixie şi moarte;
– stadiul de recuperare, caracterizat prin vindecarea leziunilor tegumentare şi scăderea temperaturii corpului.

Efectele inhibitorii ale micotoxinelor trichotecene asupra celulelor care se divid rapid, a constituit baza evaluării acestor compuşi ca posibili agenţi chimioterapeutici antitumorali, la sfârşitul anilor '70. Rezultatele au arătat că activitatea antitumorală a fost minimă sau absentă.

Suinele sunt mai sensibile decât alte specii domestice, la trichotecene. Efectele la concentraţiile cele mai scăzute de trichotecene se manifestă prin reducerea ingestiei de hrană şi a ratei de creştere. Rumegătoarele detoxifică cea mai mare parte a trichotecenelor în rumen şi sunt considerate ca rezistente, comparativ cu suinele.

Scanned with OKEN Scanner

Păsările domestice au o sensibilitate intermediară la acţiunea toxică a trichotecenelor.

*Extracţia.* Cei mai folosiţi solvenţi pentru extracţia trichotecenelor sunt cloroformul, acetatul de etil, metanolul, acetonitrilul, metanolul apos şi acetonitrilul în soluţie apoasă. Trichotecenele sunt, în general, stabile. De exemplu, DON poate fi păstrat în solvenţi organici (acetat de etil), pentru un interval îndelungat, fără pierderea semnificativă a activităţii toxice.

După tratamentul cu o bază, trichotecenele care conţin un grup esteric sunt hidrolizate la alcoolul corespunzător. Grupările OH libere sunt uşor acilate. Grupul epoxi 12, 13 este foarte stabil la atacul nucleofilic. Fierberea prelungită în condiţii acide produce o rearanjare intramoleculară a scheletului moleculelor de trichotecene, la inelul apotrichotecenic.

*Metodele* pentru identificarea trichotecenelor sunt *chimice* (TLC-*t*hin *l*ayer *c*hromatography), HPLC (*h*igh *p*erformance *l*iquid *c*romatography), GC (*g*as *c*romatography), MS (*m*ass *s*pectroscopy) şi *biologice*. Aproape toate trichotecenele se pot distinge una de alta prin metoda TLC, pe plăci de gel de siliciu sau de alumină. Compuşii sunt vizualizaţi prin expunerea plăcii la vapori de iod sau prin tratament cu $H_2SO_4$ concentrat şi încălzire la 100-110°. La lumina UV, trichotecenele au fluorescenţă albastră, cu excepţia celor care conţin gruparea ceto C-8 (Ueno, 1977).

Pentru identificarea toxinei T-2 se foloseşte metoda *RIA* (radio-immuno-assay). Anticorpii specifici s-au obţinut prin imunizarea iepurelui cu conjugatul ASB (albumină serică bovină) – toxină T-2 -hemisuccinat. Anticorpii care se sintetizează faţă de conjugat au cea mai mare afinitate de legare pentru toxina T-2. Reacţia încrucişată cu alte trichotecene este foarte slabă sau absentă. Limita detectării este variabilă, fiind cuprinsă între 1–20 ng/g. Metoda a fost aplicată pentru determinarea prezenţei toxinei T-2 în produsele agricole, în fluidele biologice, în carne.

Pentru cuantificarea rapidă a toxinei T-2 în produsele vegetale şi animale s-a elaborat metoda ELISA.

*Metoda biologică* a detectării efectului toxinei este foarte importantă pentru cazurile în care cauza intoxicaţiei nu este clară. Producerea efectului trebuie asociată cu prezenţa toxinei.

Testul clasic folosit în mod curent pentru trichotecene este *testul necrozei tegumentare.* Extractele preparate din probe se aplică în doză mică pe tegumentul de iepure, şobolan, cobai. Preparatele toxice produc eritem, edem, hemoragie intradermică şi necroză. Cobaiul este cel mai sensibil la trichotecene. Cele macrociclice sunt foarte iritante pentru tegument. Testul tegumentar la iepure şi cobai evidenţiază 0,2 µg de toxină T-2 şi DAS.

Trichotecenele macrociclice sunt foarte iritante pentru tegument, dar NIV şi DON au un potenţial necrotic scăzut.

Scanned with OKEN Scanner

Larvele de *Artemia salina* sunt un sistem biologic util pentru monitorizarea trichotecenelor T-2, DAS şi a celor macrociclice. Sensibilitatea limită a acestui test este de de 0,04–0,4 mg.

Testul *reticulocitelor* de iepure, bazat pe inhibiţia înglobării leucinei $C^{14}$ este foarte specific pentru trichotecene.

Pentru evaluarea toxicităţii se folosesc *liniile celulare mamaliene*. Sensibilitatea la o anumită toxină este foarte variabilă. Datorită toxicităţii înalte, toxina T-2 este adeseori folosită ca martor de control pozitiv, pentru cele mai multe linii celulare.

Efectele toxice se evaluează prin utilizarea coloranţilor vitali: albastru tripan sau roşu neutru. Testele se bazează pe încorporarea colorantului şi reducerea sa la forma incoloră în celulele vii. Compuşii chimici care lezează membrana plasmatică sau membranele lizosomale diminuă înglobarea şi retenţia colorantului. Roşu neutru s-a folosit cu succes pentru determinarea efectelor citotoxice ale trichotecenelor.

Câteva studii folosesc testul clivării *dimetiltiazol-difenil tetrazolium bromid*, care evaluează reducerea sării de tetrazoliu de culoare galbenă, sub acţiunea dehidrogenazei mitocondriale a celulelor viabile, cu formarea cristalelor de formazan, de culoare închisă.

Aceste metode sunt nespecifice deoarece evaluează citotoxicitatea generală (celule vii/celule moarte) sau diminuarea ratei de multiplicare celulară.

Pentru detectarea limitelor inferioare ale toxicităţii se folosesc metode mai *specifice*. De exemplu, aflatoxina $B_1$ acţionează asupra hepatocitelor, toxina T-2 (un imunosupresor recunoscut) acţionează asupra limfocitelor, citrinina are toxicitate maximă asupra celulelor renale, iar trichotecenele de tip A alterează semnificativ funcţiile membranei celulare. Pentru evaluarea toxicităţii DON cele mai sensibile sunt celulele limfoide şi fibroblastele.

Trichotecenele nu au un grup funcţional care să permită identificarea prin metoda spectrometrică sau fluorimetrică şi nu reacţionează specific cu nici un reactiv care să constituie un instrument pentru determinarea colorimetrică.

### *Ochratoxine*

*Ochratoxinele* formează un grup de derivaţi strâns înrudiţi ai *izocumarinei*, legată de *L-fenilalanină*. După originea căii de biosinteză, aceste toxine aparţin *poliketidelor* (fig. 31).

Ochratoxina A este o substanţă cristalină, incoloră, obţinută prin cristalizare după extracţie cu benzen. Este solubilă în solvenţii organici polari şi puţin solubilă în apă. Primul compus identificat este *ochratoxina A*, în culturile de *Aspergillus ochraceus*.

Toxinele grupului produc efecte nefrotoxice şi hepatotoxice şi sunt sintetizate de specii ale genurilor *Aspergillus* şi *Penicillium*, cu o răspândire ubicvitară, iar potenţialul de contaminare al produselor vegetale şi animale este foarte mare. *Penicillium* produce toxina chiar la 4°, iar *Aspergillus*, la 12–37°. Tulpinile de *A. ochraceus* izolate din regiunile cu climat temperat produc toxine în proporţie de

Scanned with OKEN Scanner

28–50%. Cea mai mare cantitate de ochratoxină este produsă pe cereale şi mai puţin pe seminţele de cafea, soia, cacao. Ochratoxina B apare foarte rar.

Ochratoxina A contaminează alimentele cu o frecvenţă cuprinsă între 2–30%.

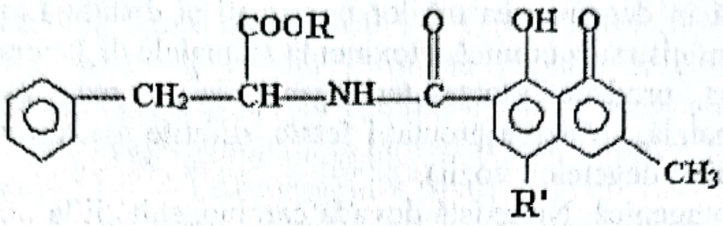



Fig. 31 – Structura chimică a ochratoxinelor : ochratoxina A : R'=Cl, R=H; ochratoxina B: R'=H, R=H; ochratoxina C: R'= Cl, R= $C_2H_5$ ; metil esterul ochratoxinei A : R'= $Cl_2$, R= $CH_3$ ; metil sau etil esterul ochratoxinei B: R'= H, R= $CH_3$ sau $C_2H_5$.

*Modul de acţiune.* Ochratoxina A este inhibitor al ARNt-sintetazei şi al sintezei proteinelor la microorganisme şi în celulele hepatomului de şobolan. Efectul inhibitor poate fi prevenit prin adăugarea fenilalaninei în mediul de cultură al celulelor la un raport molar de 1,7 :1. Această observaţie a sugerat posibilitatea măsurilor preventive faţă de intoxicaţia cu ochratoxină A. Efectul toxic se produce în special asupra celulelor în metafază şi, în funcţie de doză, rezultă celule multinucleate sau citoliza.

Ochratoxina A influenţează metabolismul glucidic (diminuă cantitatea de glicogen din ficat), inhibă activitatea celulelor NK, dar nu influenţează funcţia imunitară, acţionează ca inhibitor competitiv al proteinelor transportoare din membrana internă a mitocondriilor.

Ochratoxina A s-a detectat în sângele a 6–18% din populaţia umană din regiunea balcanică, unde produce *nefropatia cronică*. Există tendinţa asocierii familiale a cazurilor, ceea ce sugerează rolul factorilor genetici în manifestarea maladiei. În afara ariilor endemice, cazurile sunt sporadice. Rinichii sunt reduşi ca dimensiuni. Leziunile sunt caracterizate prin fibroză interstiţială, degenerare tubulară, hialinizarea glomerulilor în cortexul superficial.

Nefropatia endemică din Balcani este asociată cu o incidenţă înaltă a *tumorilor* în tractul urinar: neoplazii ale pelvisului renal şi ale ureterelor.

*Metabolism.* Ochratoxina este absorbită în special la nivelul stomacului şi jejunului proximal. La animalele monogastrice (porc), ochratoxina A, nemodificată, se găseşte în toate ţesuturile cercetate (rinichi, ficat, muşchi). Ochratoxina A se leagă de albumina serică şi este eliminată prin excreţie şi pe cale digestivă, sub forma ochratoxinei A şi α, dar trece şi în secreţia lactată.

În rumenul rumegătoarelor, ochratoxina este clivată de enzimele protozoarelor şi bacteriilor. Ochratoxina α (netoxică) se găseşte în toate ţesuturile.

Prin hidroliză acidă, ochratoxina A produce *fenilalanina* şi *izocumarina* (ochratoxina α), un produs care se găseşte în intestin, în urină, în ficatul

rozătoarelor, după administrarea experimentală a ochratoxinelor. Este toxică pentru ficat şi rinichi şi este suspectată pentru potenţialul carcinogen.

La porc produce nefropatia: degenerarea tubilor proximali, urmată de atrofia epiteliului tubular, fibroza interstiţială a cortexului renal. La puiul de găină, nefropatia constă în degenerarea tubilor proximali şi distali. Leziunile renale se reproduc prin administrarea cronică a toxinei la animalele de laborator.

Ochratoxina produce efecte teratogene: la şoarece este asociată cu mortalitatea prenatală, scăderea greutăţii fetale, diferite malformaţii (exencefalie, anomalii ale ochilor, degetelor, cozii).

Nu este mutagenică. Nu există dovada carcinogenităţii la om, dar la şoarecii masculi, ochratoxina A este un carcinogen hepatic şi renal, deorece are rolul de iniţiator* şi promotor al dezvoltării nodulilor hepatici hiperplazici.

* Iniţiatorii sunt carcinogeni care acţionează prin efectul lor *mutagen*, dar singuri, de obicei nu produc malignizarea (deşi uneori acţionează atât ca iniţiatori cât şi ca promotori), deoarece mecanismele de reparare a ADN sunt eficiente (acţionează rapid şi fără erori).

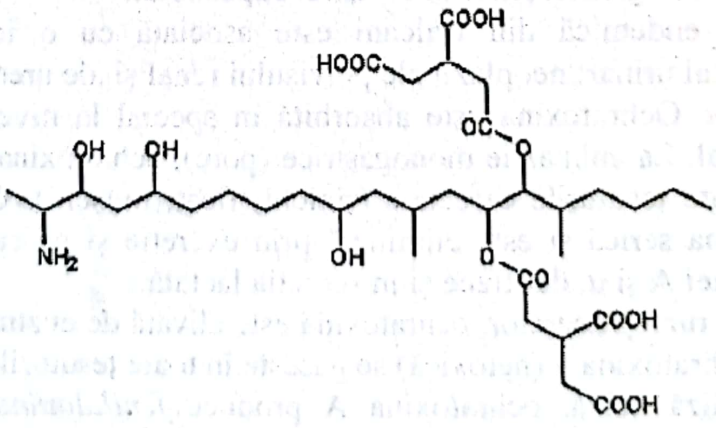
*Fumonisine*

*Fumonisinele* sunt un grup important de toxine, deoarece produc câteva maladii toxice la animale. Structura chimică de bază este un diester de propan-1,2,3 acid tricarboxilic şi un pentahidroxicozan care conţine un grup amino primar. Fumonisinele au asemănare structurală evidentă cu lipidul *sfingozina* din creier. Membrii seriei A sunt acetilaţi la grupul $NH_2$, sunt produşi în cantităţi mici şi au activitate biologică scăzută. Membrii seriei C sunt identici cu ai seriei B, dar nu au grupul $C_1$ metil terminal.

Fumonisinele P1—P3 sunt descrise recent şi sunt caracterizate prin prezenţa unui grup funcţional – 3-hidroxipiridinic la grupul amino $C_2$.

Fumonisinele seriei B ($B_1$, $B_2$, $B_3$, $B_4$) sunt cei mai abundenţi contaminanţi ai furajelor şi au toxicitatea cea mai mare pentru animalele de laborator.

*Fumonisina $B_1$* produce intoxicaţii la animale, după consumul furajelor contaminate cu *Fusarium moniliforme*: leucoencefalomalacia equidelor şi edemul pulmonar al suinelor.



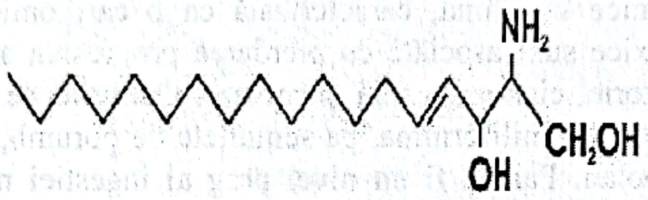

Fumonisina $B_1$

Leucoencefalomalacia este o maladie gravă, mortală a calului, ce constă în lichefierea ţesutului nervos.

Fumonisinele nu sunt genotoxice, dar sunt promotori potenţiali ai carcinomului hepatic pentru că induc sinteza γ-glutamil-transpeptidazei (GGT) şi glutation –S-tranferazei (GST) în ficatul de şobolan.

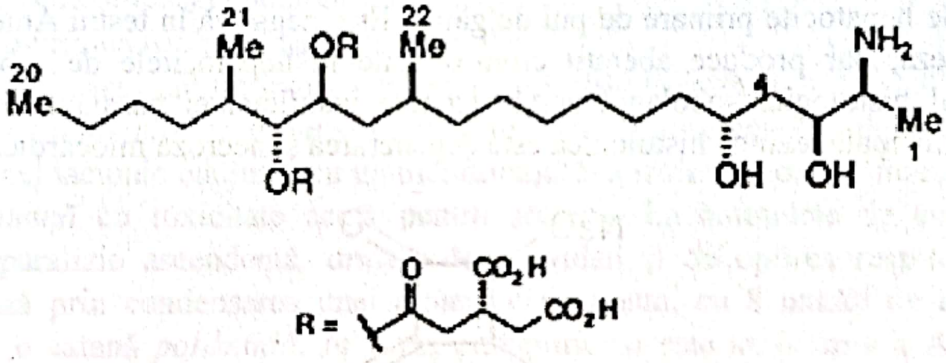
Impactul fumonisinelor asupra stării de sănătate a omului este incert. Consumul porumbului contaminat cu *Fusarium moniliforme* s-a corelat cu rate înalte de neoplasme esofagiene în Africa de sud şi China, dar probabil există şi alţi factori favorizanţi.

Fumonosina $B_1$ are aceeaşi catenă de C ca şi *sfingozina* şi sfinganina.




Sfingozina

Fumonisina $B_2$ diferă de $B_1$ prin numărul şi localizarea grupărilor OH la $C_5$ şi $C_{10}$.




Fumonisina $B_2$

Fumonisina $B_1$ inhibă competitiv activitatea *ceramid-sintazei* şi astfel blochează sinteza *de novo* a sfingolipidelor, metabolismul sfingolipidelor şi teoretic, perturbă reglarea funcţiilor celulare mediate de sfingolipide, inclusiv apoptoza şi mitoza. Perturbarea metabolismului sfingolipidelor produce efectul citotoxic şi carcinogenic. Nivelul maxim acceptat în furajele cailor este de 5 ppm.

Fumonisinele se găsesc asociate cel mai adesea cu *moniliformina*. Prezenţa lor are implicaţii importante pentru starea sănătăţii animalelor: produce *leucoencefalomalacia* la equide şi *edemul pulmonar* la porc, efecte imunosupresoare şi deficit al vitaminei A la păsări.

Fumonisinele sunt hepatocarcinogene. Sunt inhibitori puternici ai sintezei proteinelor, ai ceramid-sintazei şi induc aberaţii cromosomale în hepatocitele de şobolan.

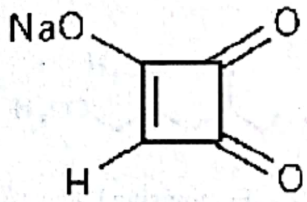
Scanned with OKEN Scanner

*Acidul 3-nitropropionic* este metabolitul secundar al speciilor de *Arthrinium* şi poate produce o intoxicaţie acută alimentară, cunoscută ca intoxicaţia cu trestia de zahăr alterată de fungi. La copii, consumul zahărului obţinut din materia primă produce tulburări de tonus muscular, convulsii, spasme ale muşchilor plantari, comă, leziuni ale nucleilor striaţi.

$$O_2N—CH_2—CH_2—COOH$$

Acid 3-nitro-propionic

*Moniliformina* produsă de *Fusarium moniliforme* este suspectată de producerea unei maladii endemice în China, caracterizată ca o cardiomiopatie. La păsări, efectele acute şi toxice sunt asociate cu pierderea progresivă a forţei musculare, insuficienţă respiratorie, cianoză, comă şi moarte. Culturile de *Fusarium moniliforme* care sintetizează moniliformina, pe seminţele de porumb, produc fenomene toxice acute la şobolan. Pare a fi un nivel prag al ingestiei moniliforminei din alimente, peste care moartea survine foarte rapid. Sub pragul critic, şobolanul tolerează cantităţi mari de moniliformină fără efecte toxice aparente. Mecanismul acţiuii este selectiv: moniliformina inhibă sistemele enzimatice ale piruvat-dehidrogenazei şi α-cetoglutarat-dehidrogenazei, precum şi gluconeogeneza în cultura de hepatocite primare de pui de găină. Este negativă în testul Ames pentru mutageneză, dar produce aberaţii cromosomale în hepatocitele de şobolan. La examenul histologic, şobolanul arată semnele insuficienţei cardiace congestive acute. Principala leziune histologică este degenerarea şi necroza miocardică acută.

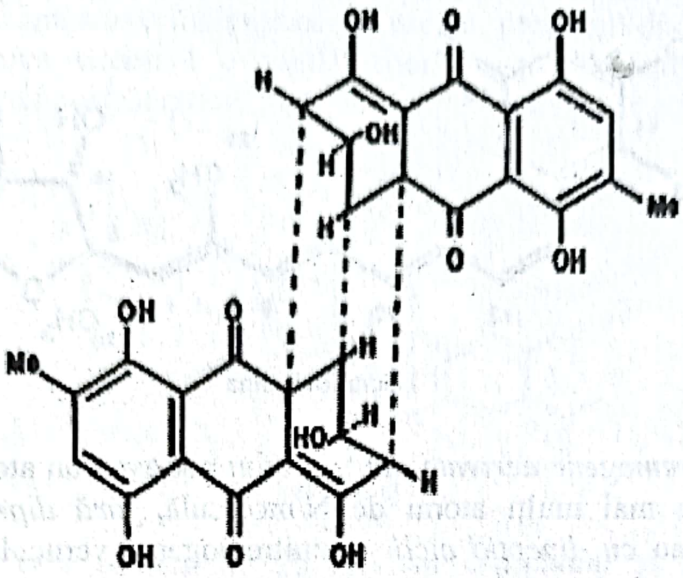



Moniliformina

*Penicillium islandicum* sintetizează *luteoskirina*, o hepatotoxină carcinogenă care influenţează funcţia mitocondriilor şi se leagă cu ADN la situsul bazelor pirimidinice în prezenţa ionilor de Mg. Complexul ADN-$Mg^{2+}$-luteoskirină s-a izolat prin filtrare pe gel sephadex. Probabil că legarea luteoskirinei se face printr-un mecanism asemănător cu acela al legării actinomicinei D: molecula se intercalează între perechile de baze ale ADN. Consumul pe termen lung al orezului contaminat cu *Penicillium islandicum* sau cu luteoskirina produce atrofie hepatică acută, ciroză şi carcinom hepatic la şoarece.

Toxina se sintetizează în faza târzie de creştere a *Penicillium islandicum* (la 18 zile), în cultură staţionară pe mediul lichid cu dextroză şi cartof, la pH optim uşor acid sau neutru.

Scanned with OKEN Scanner



Luteoskirina

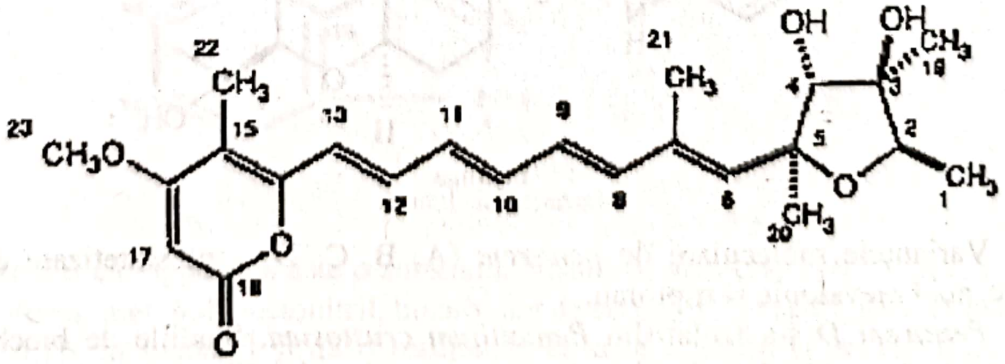
*Micotoxine tremogene*

Toate toxinele acestui grup induc tulburări nervoase la animale. S-au izolat două grupe de compuşi cu acţiune asupra SNC :

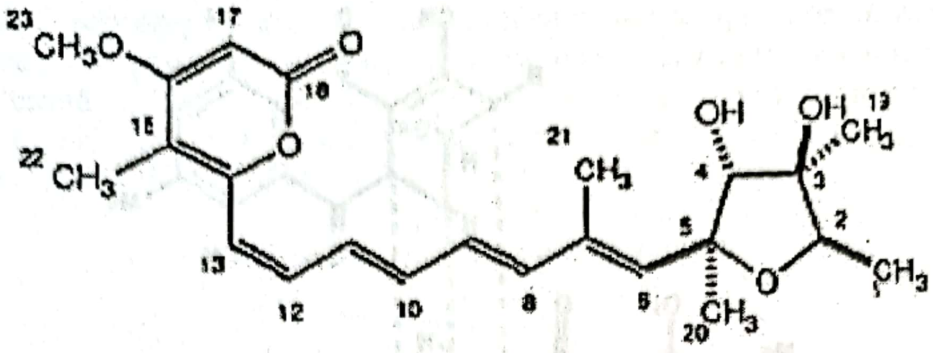
– citreoviridina (polienă carbociclică);

– compuşi care conţin triptofan, ca intermediar al biosintezei.

*Penicillium citreonigrum* produce *citreoviridina*, a cărei moleculă constă dintr-un inel lactonic conjugat cu un inel furanic. S-a izolat din orezul infectat. Este o *neurotoxină* cu toxicitate acută pentru şoarece. La animalele de experienţă produce paralizie ascendentă, urmată de convulsii şi de oprirea respiraţiei. Se sintetizează prin condensarea unei molecule de acetat, cu 8 unităţi de malonat, rezultând o catenă *poliketidă*. *In vitro*, citreoviridina este inhibitorie a ATP-azei mitocondriale. Toxina este instabilă: analiza prin RMN (rezonanţă magnetică nucleară) a evidenţiat că în prezenţa luminii, toxina se izomerizează (fotoizomerizare) la izocitreoviridină.



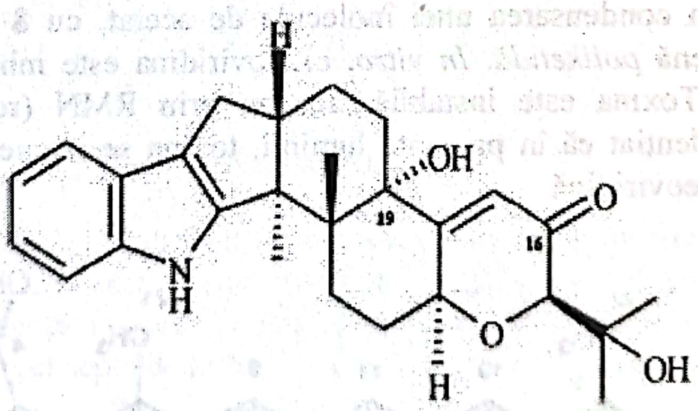
Citreoviridina



Isocitreoviridina

*Toxinele tremogene derivate din triptofan* pot avea un atom de N (penitrem, paxilina), 2 sau mai mulţi atomi de N/moleculă, *fără dipeptid ciclic* (acidul *ciclopiazonic*) sau *cu dipeptid ciclic* (fumitremogene, veruculogen, roquefortina, triptoquivalina).

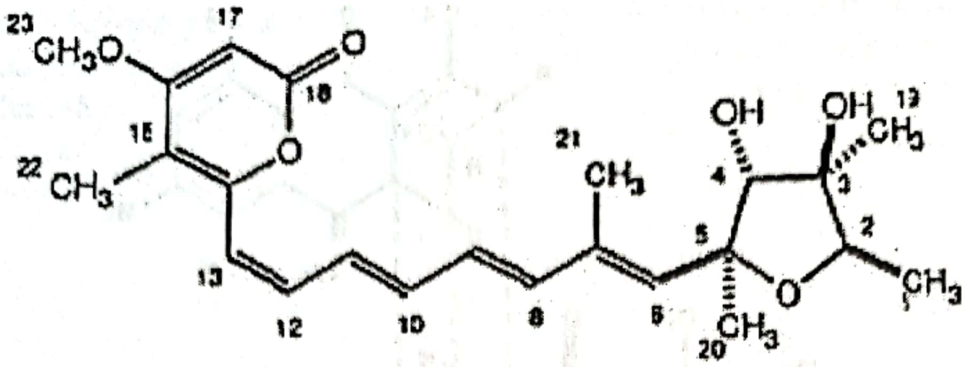
*Paxilina*, produsă de *Penicillium paxilline* are toxicitate scăzută, dar produce tremur la şoarece. Se sintetizează din triptofan şi mevalonat. Este asemănătoare *paspalinei*, un alcaloid tremogen produs de *Claviceps paspali*. Are o structură moleculară de tipul alcaloizilor şi este un inhibitor reversibil al receptorului *inozitol-trifosfat* ($IP_3$). Toxina inhibă eliberarea $Ca^{2+}$ dependentă de $IP_3$. Deschiderea receptorului inozitol-trifosfat şi creşterea concentraţiei $Ca^{2+}$ intracelular este esenţială pentru multe procese celulare metabolice şi secretorii. Capacitatea de a induce tremurul este dependentă, în mod esenţial, de un grup OH la poziţia 19 a nucleului diterpenic. Alcaloizii tremogeni, aşa cum este paxilina, sunt cei mai puternici şi mai selectivi inhibitori nepeptidici ai canalelor de K, cunoscute sub denumirea de canale maxi-K.



Paxilina

Variantele moleculare de *penitrem* (A, B, C, D) sunt sintetizate din acid acetic, acid mevalonic şi triptofan.

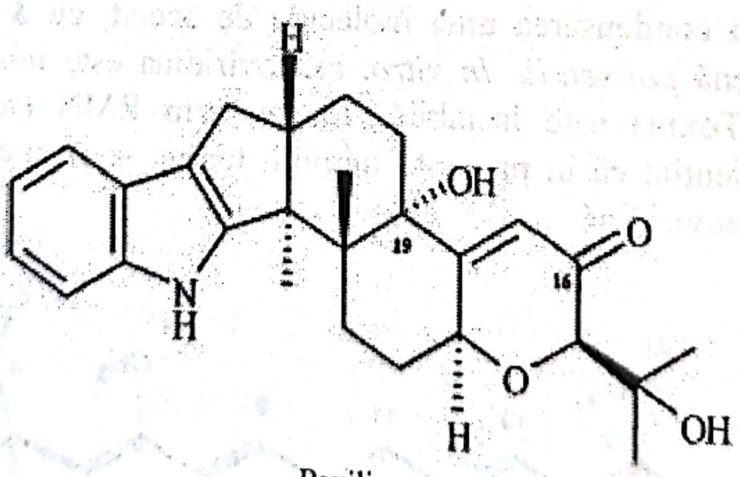
*Penitrem D* s-a izolat din *Penicillium crustosum*. Studiile de biochimie şi farmacologie arată că toxina interferă cu mecanismele eliberării aminoacizilor cu



Isocitreoviridina

*Toxinele tremogene derivate din triptofan* pot avea un atom de N (penitrem, paxilina), 2 sau mai mulţi atomi de N/moleculă, *fără dipeptid ciclic* (acidul *ciclopiazonic*) sau *cu dipeptid ciclic* (fumitremogene, veruculogen, roquefortina, triptoquivalina).

*Paxilina*, produsă de *Penicillium paxilline* are toxicitate scăzută, dar produce tremur la şoarece. Se sintetizează din triptofan şi mevalonat. Este asemănătoare *paspalinei*, un alcaloid tremogen produs de *Claviceps paspali*. Are o structură moleculară de tipul alcaloizilor şi este un inhibitor reversibil al receptorului *inozitol-trifosfat* ($IP_3$). Toxina inhibă eliberarea $Ca^{2+}$ dependentă de $IP_3$. Deschiderea receptorului inozitol-trifosfat şi creşterea concentraţiei $Ca^{2+}$ intracelular este esenţială pentru multe procese celulare metabolice şi secretorii. Capacitatea de a induce tremurul este dependentă, în mod esenţial, de un grup OH la poziţia 19 a nucleului diterpenic. Alcaloizii tremogeni, aşa cum este paxilina, sunt cei mai puternici şi mai selectivi inhibitori nepeptidici ai canalelor de K, cunoscute sub denumirea de canale maxi-K.

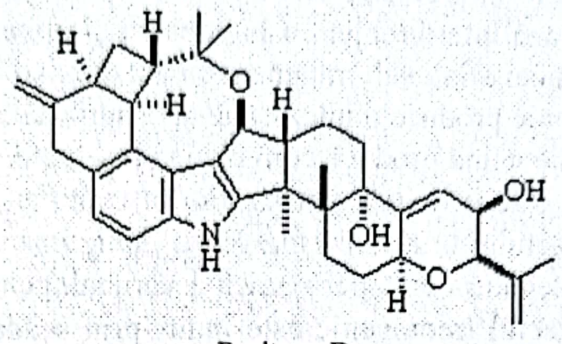


Paxilina

Variantele moleculare de *penitrem* (A, B, C, D) sunt sintetizate din acid acetic, acid mevalonic şi triptofan.

*Penitrem D* s-a izolat din *Penicillium crustosum*. Studiile de biochimie şi farmacologie arată că toxina interferă cu mecanismele eliberării aminoacizilor cu

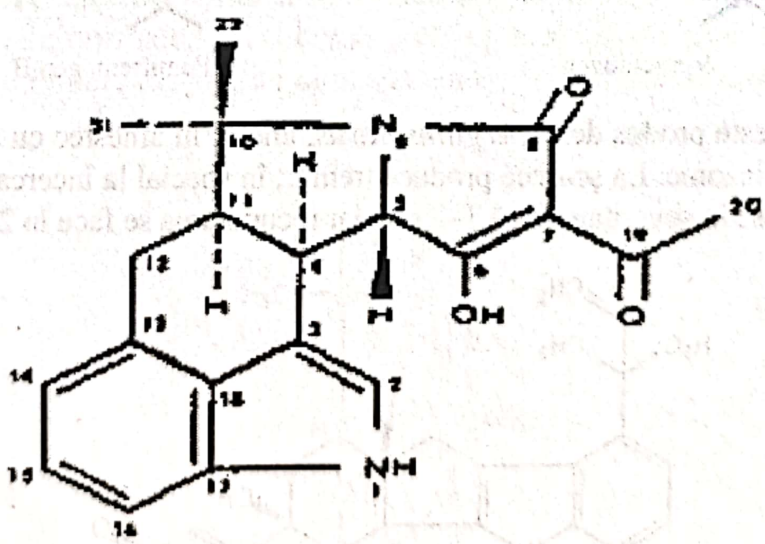
rol de mediatori ai transmiterii sinaptice. În esență, compușii din grupul penitrem stimulează eliberarea excesivă a mediatorilor în spațiul sinaptic și saturează receptorii membranei postsinaptice.



Penitrem D

*Penitrem A* este produs de *Penicillium crustosum* și produce maladii neurologice la animalele domestice. Tremurul este indus prin efectul antagonist față de sinteza *glicinei*, mediatorul cunoscut ca inhibitor al neuronilor intercalari din măduva spinării.

*Acidul ciclopiazonic* are mai mult de un atom de N, fără dipeptide ciclice. Este un acid indol tetramic, izolat din *Penicillium cyclopium, P. commune, P. camemberti, Aspergillus flavus, Aspergillus versicolor.* Este o micotoxină importantă, deoarece este produsă de fungi care infectează alimentele. Pentru că este sintetizat de *A. flavus* – producător de aflatoxină, este posibilă apariția concomitentă a celor două toxine. Se sintetizează din triptofan, acid mevalonic și acid acetic.



Acidul ciclopiazonic

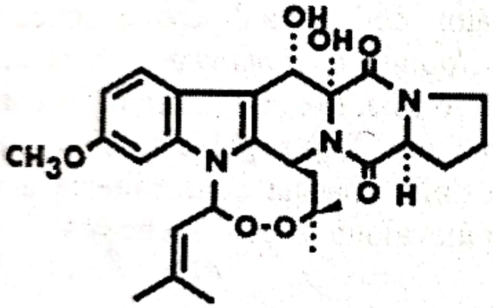
Acidul ciclopiazonic este o substanță cristalină, incoloră, optic activă, solubilă în cloroform, metanol, acetonitril, bicarbonat de sodiu, stabil la 4°. Reacționează cu $H_2SO_4$ 0,1N în metanol și dă o reacție de culoare albastru-violetă și cu clorura ferică, într-o reacție de culoare oranj-roșie.

Acidul ciclopiazonic este o neurotoxină după administrare intraperitoneală la şobolan, cu DL50 de 2,3 mg/kg. Administrarea orală nu produce convulsii, iar DL50 este de 36 mg/kg la masculi şi 63 mg/kg la femele. Produce leziuni în ficat, rinichi, splină, cu scădere în greutate, deshidratare, hipokinezie, convulsie, moarte. Unele efecte se datorează interferenţei cu înglobarea şi eliberarea $Ca^{2+}$ şi prezintă un risc potenţial pentru cei aflaţi sub tratament cu antagonişti ai $Ca^{2+}$.

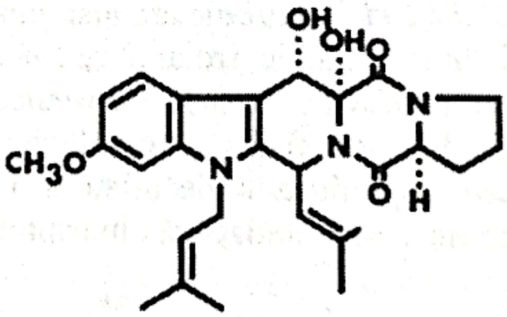
Acidul ciclopiazonic produce o intoxicaţie caracterizată clinic prin somnolenţă, tremur, vertij. La puii de găină produce convulsii şi rigiditate.

*Fumitremogenul* este o toxină sintetizată din triptofan şi prolină. Injectarea intraperitoneală a extractului brut din *Aspergillus fumigatus* are acţiune tremogenă puternică la şoarece. Legătura endoperoxidică a veruculogenului se regăseşte şi la fumitremogenul A. Efectul tremogenic este indus prin scăderea cantităţii de acid gama-aminobutiric (GABA) în SNC.

*Veruculogenul,* ca şi penitremul, este antagonist al sintezei mediatorilor neuronilor inhibitori, ceea ce determină pierderea controlului central asupra tonusului muscular şi preciziei mişcării.

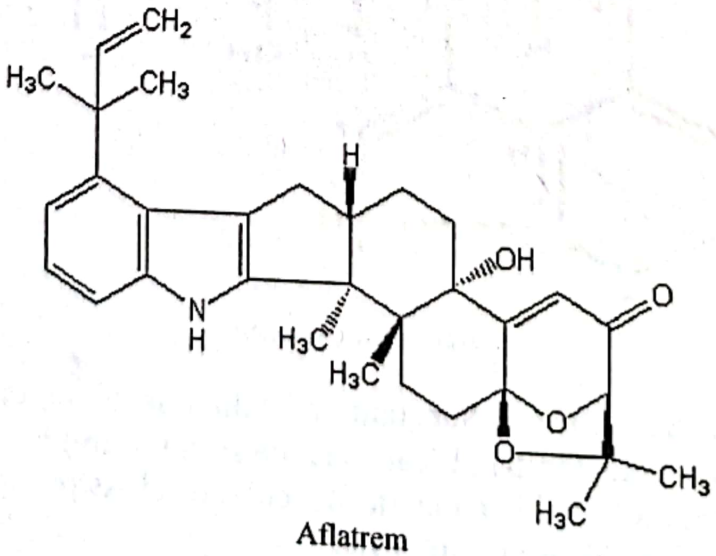



Veruculogen




Fumitremogen B

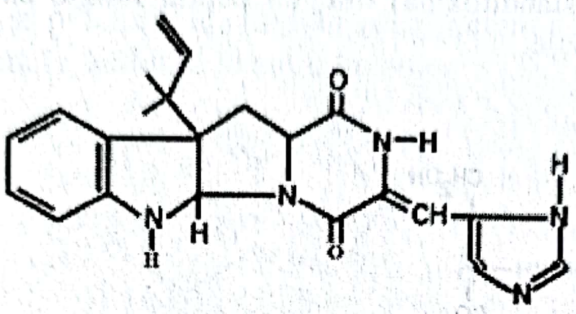
*Aflatrem* este produs de *Aspergillus flavus*, uneori în amestec cu aflatoxina $B_1$ şi cu acidul ciclopiazonic. La şoarece produce tremur, în special la încercarea de mişcare. Simptomele cresc în severitate după 1–2 ore, iar recuperarea se face în 24–48 de ore.




Aflatrem

Scanned with OKEN Scanner

*Roquefortina C* este produsă constant şi semnificativ de *Penicillium roqueforti*, cultivat pe mediu cu extract de levuri, dar şi în brânzeturile fermentate. Are proprietăţi neurotoxice: doze de 50–100 mg/kg la şoarece induc starea de prostraţie. Pentru om, toxicitatea este nesemnificativă. Se sintetizează din triptofan şi histidină.

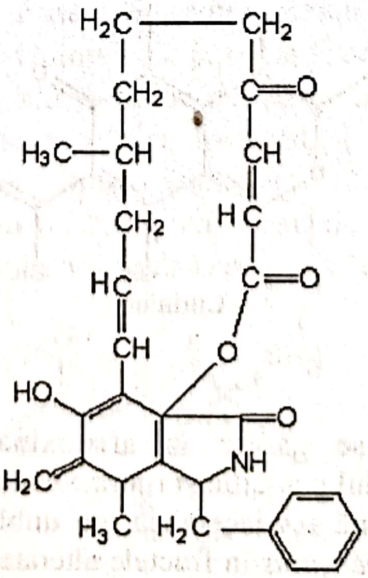


Roquefortina

*Tetrapeptidele ciclice* care conţin triptofan sunt citochalazina (cu variantele B, C, E, F, H), triptoquivalina, triptoquivalona. Ultimele două sunt metaboliţi tremogenici.

Animalele intoxicate manifestă simptomele clinice numai dacă sunt perturbate sau stresate. Semnele intoxicaţiei variază ca intensitate, de la tremurul muscular până la pierderea severă a coordonării motorii.

*Citochalazinele* formează o familie de substanţe cu activităţi biologice multiple: toate inhibă *citochineza* în celulele de mamifere (celulele HeLa), dar nu interferă cu diviziunea nucleului şi se formează policariocite. Deoarece interferă cu procesele celulare normale, pot fi considerate ca substanţe toxice. Citochalazina B este produsă de *Phoma exigua*, iar citocalazina C, de *Metharrhizium anisopliae*.

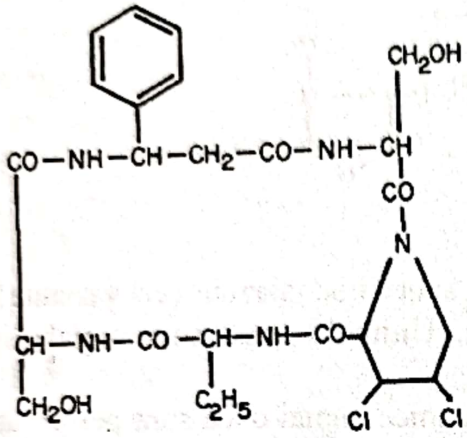


Citochalazina B

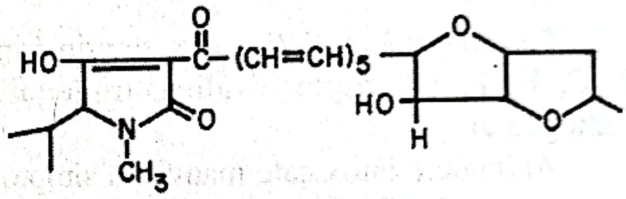
Alte toxine produse de diferite specii ale genului *Penicillium*:

- *Penicillium citrinum* – citrinina;
- *Penicillium islandicum* – *ciclocloritina, eritroskirina*;
- *Penicillium verrucossum* – ochratoxina A.

*Ciclocloritina* (islanditoxina) este un peptid fungic cu efecte hepatotoxice pentru spaţiile periportale.

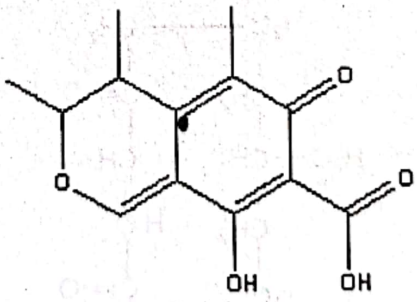


Ciclocloritina



Eritroskirina

*Citrinina* este o nefrotoxină produsă de specii ale genului *Penicillium* (*Penicillium citrinum, Penicillium verrucosum*), *Aspergillus*. Este toxică pentru rinichii tuturor speciilor de organisme, dar gradul toxicităţii acute este variabil: iepurele este mult mai rezistent decât păsările. Citrinina acţionează sinergic cu ochratoxina A şi inhibă sinteza ARN în celulele renale de şoarece. Toxina se găseşte foarte frecvent în alimente, dar importanţa clinică pentru om este nesemnificativă.



Citrinina

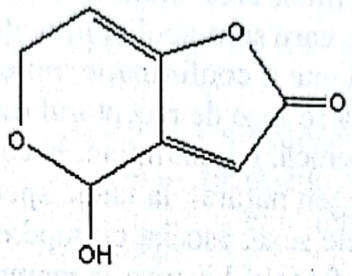
*Lactone nesaturate*

Grupările lactonice se găsesc în aflatoxină, ochratoxină, zearalenonă, citreoviridină, patulină, acidul penicilic şi rubratoxină.

***Patulina*** este o lactonă semiacetalică, cu dublă legătură nesaturată α şi β, produsă de *Penicillium, Aspergillus* în fructele alterate (mere, pere, cireşe, struguri). Este inhibitoare a sintezei proteinelor. Are activitate antibiotică, antivirală, inhibă

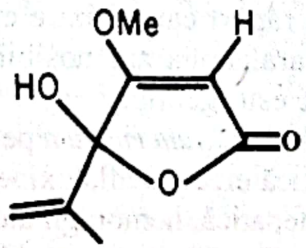
dezvoltarea protozoarelor şi a fost utilizată (în anii '50) pentru tratamentul infecţiilor fungice tegumentare. Proprietăţile toxice sunt mai puternice decât cele antibiotice: este toxică pentru plante şi animale şi determină hemoragii cerebrale şi pulmonare. După administrare de durată (15–18 luni), produce sarcoame la şobolan, la locul injectării.

Patulina se găseşte practic totdeauna în sucul nefermentat de mere, dar se inactivează prin fermentaţie, astfel că în cidru lipseşte.




Patulina

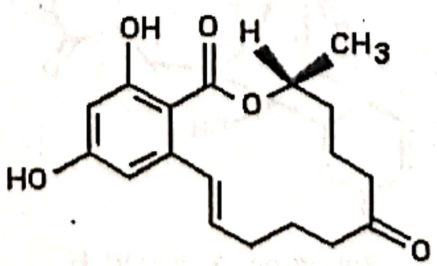
*Acidul penicilic* are efect letal pentru şoarece, la doza de 200–300 mg/kg. Este sintetizat de *Penicillium crustosum* sub forma a doi izomeri: lactonic şi cetonic.




Acidul penicilic

*Zearalenona* produsă de *Fusarium graminearum, F. culmorum, F. equiseti, F. poae* etc. se sintetizează pe seminţele de porumb şi derivatele sale. Aceste specii colonizează cerealele şi au tendinţa să se dezvolte atât în timpul sezonului de creştere, cât şi în perioada de recoltare, în condiţii de umiditate. Toxina este produsă pe seminţele de grâu, orz, orez, porumb etc.

Zearalenona este o *lactonă macrociclică,* asemănătoare ca structură hormonilor estrogeni, cu o mare afinitate de legare pentru *receptorul de hormoni estrogeni.*




Zearalenona

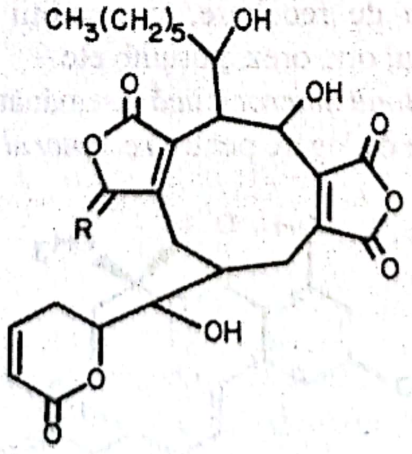
Zearalenona este un compus cristalin de culoare albă, cu fluorescenţă albastră-verde sub acţiunea radiaţiei UV cu lungime de undă de 360 nm şi o fluorescenţă verde mai intensă sub acţiunea radiaţiei de 26 nm. Este foarte puţin solubilă în apă, dar solubilă în solvenţii organici (benzen, acetonitril, clorură de metil, metanol, etanol, acetonă). Este solubilă în soluţiile apoase ale bazelor. Deşi are un inel lactonic mare, este stabilă.

*Toxicitatea* acută este scăzută. Studiile experimentale arată că zearalenona este rapid absorbită după administrarea orală la porc şi poate fi metabolizată cu formarea *zearalenolului a* şi *b*, care sunt apoi conjugaţi cu acidul glucuronic.

Zearalenona poate să adopte o conformaţie moleculară asemănătoare cu 17-β-estradiolul, ceea ce îi permite să se lege de receptorul estrogenic al celulelor ţintă şi să exercite acţiune agonistă estrogenică. La mamifere, la concentraţii mai mari de 20 ng/g în furaje, zearalenona, un estrogen natural, la unele specii produce efecte hormonale: un *simptom estrogenic* la ambele sexe, asociat cu hiperestrogenism, infertilitate, edem al organelor genitale externe la femele, hipertrofie mamară. Porcul este specia cea mai sensibilă. Concentraţiile mai mari de 50 ng/g în furaje produc un estrus constant, un sindrom de pseudosarcină evident chiar la femelele de 10 zile şi infertilitate completă.

Nu au existat diferenţe cantitative ale concentraţiei zearalenonei şi derivaţilor ei la loturile de pacienţi cu carcinom de sân, carcinom cervical sau la voluntari sănătoşi. Nu s-a evidenţiat un raport cauzal între expunerea la acest micoestrogen exogen şi efectul ulterior. Zearalenona are posibile efecte cumulative pe termen lung, asupra organelor ţintă ale estrogenilor.

*Rubratoxina*, produsă de *Penicillium rubrum* pe seminţele de porumb, este toxică pentru ţesutul hepatic şi amplifică efectele aflatoxinei, dacă se găsesc concomitent în substrat. Produce insuficienţă hepatică, hemoragii ale mucoaselor, stagnarea creşterii, este embriocidă şi teratogenă. Experienţele cu rubratoxină marcată au evidenţiat acumularea toxinei în ficat şi rinichi, la o oră după administrare. Inhibă respiraţia mitocondrială şi activitatea ARN-polimerazei dependentă de ADN, produce dezagregarea polisomilor şi inhibă sinteza proteinelor, asemănător actinomicinei D. Alimentele contaminate evidenţiază zone pigmentate de culoare roşie.




Rubratoxina A : R= OH, H
Rubratoxina B : R=O

Scanned with OKEN Scanner

*Toxine produse de fungii din genul Claviceps*

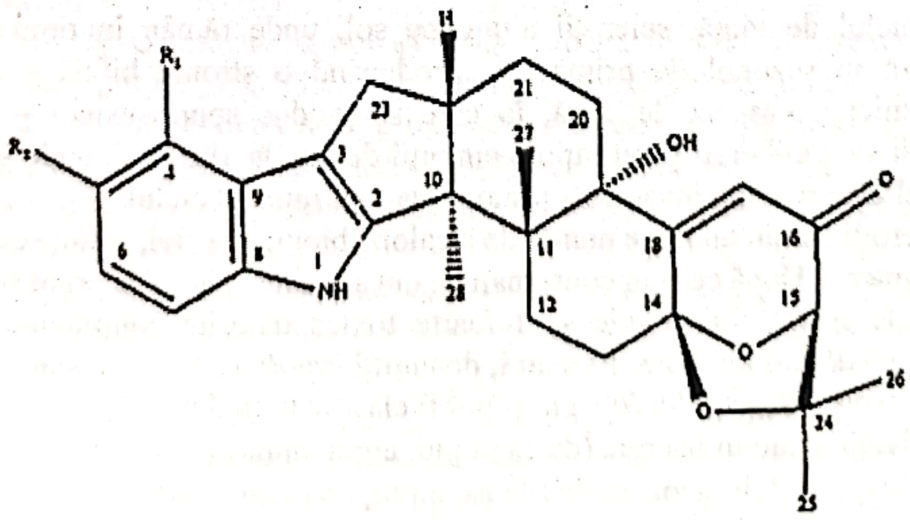
În evul mediu, zeci de mii de oameni au fost afectaţi de *ergotism*, o maladie caracterizată prin gangrenarea extremităţilor, tulburări de comportament, convulsii şi moarte, datorită consumului pâinii din făină de secară contaminată cu ciuperca *ergot** (cornul secarei) care conţine câţiva *alcaloizi indolici* din grupul *ergotaminei* (ergotamina, ergocristina, ergosina, ergometrina, ergocornina), cu acţiune asupra vaselor de sânge.

* Ergot este cuvântul francez pentru *pintenul cocoşului* şi desemnează scleroţii de *Claviceps purpurea*.

Fungii din genul *Claviceps* infectează inflorescenţele a circa 200 de specii de plante ierboase şi cereale, răspândite în toată lumea, înlocuindu-le cu structuri fungice compacte – *scleroţi* – lungi de câţiva centimetri, uneori curbaţi, de culoare închisă.

*Claviceps purpurea* infectează în primul rând speciile de plante cu polenizare încrucişată, la care florile tind să rămână deschise pentru o perioadă lungă.

Scleroţii sunt structuri hifale compacte ce se dezvoltă în coloniile multor genuri de fungi. Cei de *Claviceps* sunt unici prin dimensiunile mari (pot avea câţiva centimetri), prin coloritul şi prin conţinutul de alcaloizi biologic activi. Scleroţii se dezvoltă în timpul ciclului infecţios în plantele sensibile. Plantele gazdă pentru speciile de *Claviceps* aparţin familiei *Gramineae*, dar pot fi şi plante din familiile *Juncaceae* şi *Cyperaceae*. Cele mai multe specii de *Claviceps* au ca spectru de gazdă un singur gen, dar *C. purpurea* este unică pentru că are un spectru de gazdă foarte larg. Toate cele 8 specii de cereale (grâu, orez, porumb, sorg, secară, orz, ovăz, mei) pot fi gazde pentru *C. purpurea*. Omul şi animalele sunt expuse scleroţilor toxici de *C. purpurea* (2–20/1–6 mm, de culoare închisă) şi *C. fusiformis* (2–4 mm, de culoare brun-roşcată), iar scleroţii toxici de *C. paspali* prezintă un risc crescut pentru intoxicarea animalelor, datorită prezenţei *paspalicinei*.




Paspalicina

*Ciclul de viaţă. C. purpurea* infectează florile plantelor sensibile şi induce diviziunea celulelor (hiperplazie) şi creşterea volumului (hipertrofie). După infecţie, floarea secretă un suc dulce, de culoare alb-gălbuie, în care se găsesc *sporii asexuaţi* denumiţi *conidii*. Secreţia atrage zeci de specii de insecte, care preiau conidiile şi le diseminează la plantele sănătoase. Conidiile germinează, hifa penetrează în ovar şi formează un *sclerot* relativ mare (1–5 cm), de culoare închisă. Scleroţii sunt structuri de rezistenţă care permit ciupercii să supravieţuiască în condiţii adverse de mediu (fig. 32).

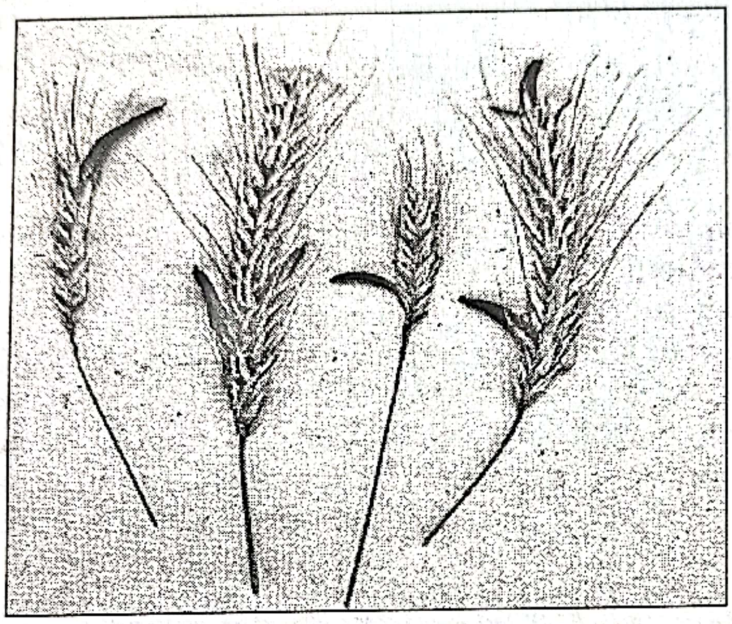


Fig. 32 – Un spic uscat de secară (*Secale cereale*) infectată cu ergot (*C. purpurea*). Unele seminţe ale spicului au fost înlocuite de o masă compactă de miceliu fungic, colorată închis, denumită scleroţiu. Scleroţiul conţine alcaloizi vasoconstrictori din grupul ergotaminei şi acidului lisergic, care este precursorul $LSD_{25}$ (dietilamida acidului lisergic).

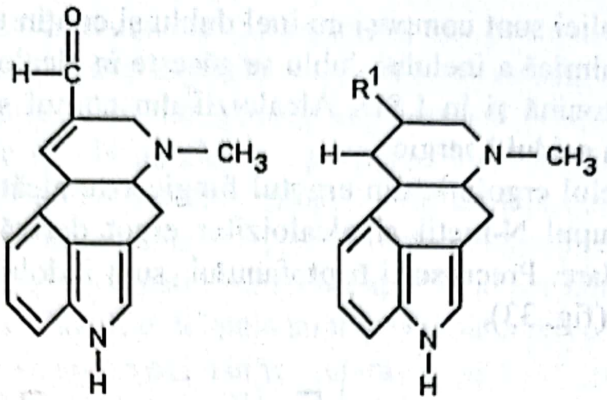
În ciclul de viaţă, scleroţii ajung pe sol, unde rămân în timpul iernii şi germinează în sezonul de primăvară, producând o stromă hifală – *apotecii* – structuri mici cu aspect de cupă, în care se produc spori sexuaţi – *ascospori*. Ascosporii sunt eliberaţi şi purtaţi de curenţii de aer, la alte flori, unde germinează şi miceliul care rezultă, invadează ţesutul ovarian, reluând ciclul.

Scleroţii conţin un mare număr de alcaloizi biologic activi, aminoacizi, glucide, lipide, pigmenţi. După ce sunt consumaţi de om şi animale, produc ergotismul.

Hifele sclerotului fungic sunt foarte toxice datorită conţinutului bogat în alcaloizi. *Alcaloizii* din cornul secarei, denumiţi *ergoline*, din care s-au izolat peste 40, sunt derivaţi ai *acidului lisergic* şi pot fi clasificaţi în 3 grupe:

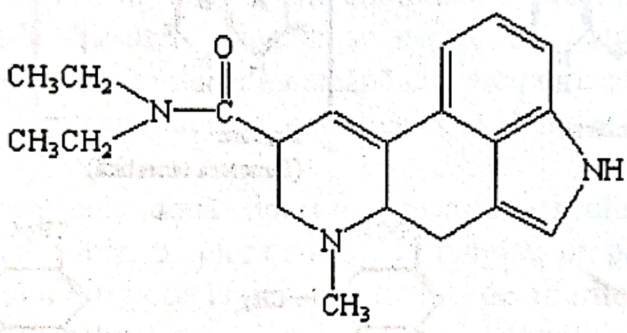
- derivaţii acidului lisergic (de exemplu, ergotamina);
- derivaţii acidului izolisergic (de exemplu, ergotaminina);
- derivaţii dimetil-ergolinei (alcaloizii clavinici, de exemplu, agroclavina).

Scanned with OKEN Scanner



Structura chimică a ergolinelor

Dietilamida acidului lisergic (LSD), utilizat ca medicament este un alcaloid. LSD nu se găseşte în cornul secarei, dar scleroţii sunt sursa de acid lisergic, folosit ulterior pentru producerea LSD.



Dietilamida acidului lisergic

Alcaloizii ergot au fost izolaţi şi de la alţi fungi (*Aspergillus fumigatus*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium*) şi de la plante (*Rivea corymbosa*, *Ipomoea violacea*, *Ipomoea tricolor*, *Ipomoea argyrophylla*).

Pentru producerea alcaloizilor, *C. purpurea* se cultivă în condiţii de laborator, în mediul lichid.

Scleroţii de *C. purpurea* pot să conţină până la 1% din greutatea uscată ergolinele din grupul I şi II. Ergocristina este ergolina majoră din făină, concentraţia maximă găsită fiind de 62 µg/kg. Tratamentul scleroţilor cu clor şi încălzire la 150–200° a dus la pierderea a 90% din conţinutul ergolinei în 4 ore.

Deoarece sunt vasoconstrictori puternici, aceşti alcaloizi produc gangrene*, dacă sunt ingeraţi în doze mari.

* Ergotismul a fost cunoscut sub denumirea de « focul sfântului Anton », deoarece unul dintre simptomele bolii este senzaţia puternică de arsură. Între anii 990–1129, peste 50 000 de oameni au murit în Franţa, datorită intoxicaţiei cu ergot. În 1093, maladia a avut efecte devastatoare şi de atunci comunitatea şi-a ales un patron protector. În 1597, maladia s-a asociat cu ciuperca denumită cornul secarei (ergot). Altă formă de ergotism se manifestă prin halucinaţii severe, tulburări de comportament, cauzate de alcaloizii psihoactivi din scleroţi.

Structura chimică a alcaloizilor din scleroţi este foarte asemănătoare cu a mediatorului sinaptic – dopamina.

Alcaloizii indolici sunt compuşi cu inel dublu şi conţin un ciclu indolic cu N şi cu C. Structura chimică a inelului dublu se găseşte în alcaloizii fungici *ergina* şi *psilocibina*, în serotonină şi în LSD. Alcaloizii din cornul secarei sunt alcaloizi clavinici derivaţi din acidul lisergic.

*Biosinteza.* Inelul ergolinic din ergotul fungic este alcătuit din L-triptofan şi acid mevalonic. Grupul N-metil al alcaloizilor ergot derivă din metionină prin reacţia de transmetilare. Precursorii triptofanului sunt indolul, acidul antranilic şi acidul indol-piruvic (fig. 33).

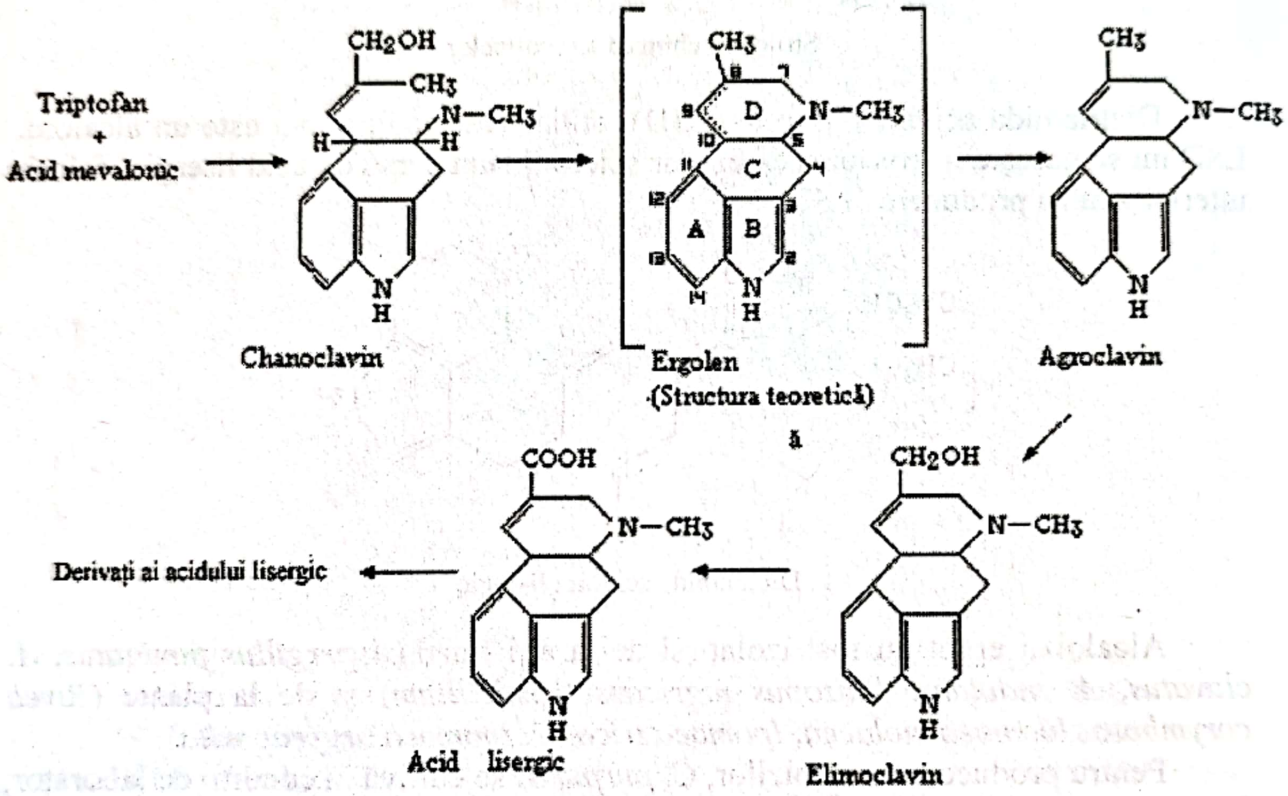



Fig. 33 – Calea biosintezei ergolinelor.

Acţiunea *alcaloizilor tropan* la nivel celular este complexă şi este legată de structura lor moleculară, în special a N metilat. Această structură chimică se găseşte în molecule de *acetilcolină*, mediatorul chimic al sinapselor neuromusculare şi neuro-neuronale. Proprietăţile anestezice ale alcaloizilor tropan se pot datora interferenţei lor cu acetilcolina, probabil prin competiţie la nivelul joncţiunilor sinaptice, blocând sau inhibând propagarea impulsurilor nervoase.

La vacile hrănite cu furaje ce conţin mai mult de 10 g scleroţi/kg, primul simptom este şchiopătarea, urmată de gangrenare. Simptomele sunt mai pronunţate dacă animalele sunt menţinute la frig. Administrarea orală a cantităţii de 1 mg/kg corp/zi la vacă, produce moartea în 10 zile. Simptomele clinice apar în 1–2 zile, cu hiperventilaţie, anorexie, răcirea extremităţilor, salivaţie abundentă, inflamaţia necrotică a limbii şi intestinului. Porcul tolerează o cantitate mult mai mare de scleroţi.

Scanned with OKEN Scanner

Consumul hranei contaminate cu ergot, la om poate cauza vomă, diaree, halucinaţii, iar în cazurile grave se produce gangrenarea extremităţilor.

Intoxicaţia cu alcaloizii din grupul ergotaminei produce două tipuri de ergotism, în funcţie de specia fungică (*C. purpurea* şi *C. fusiformis*): *convulsiv* şi *gangrenos*. Ergotismul convulsiv (neurologic) este produs de alcaloizii clavinici din *C. fusiformis*, ce se manifestă prin simptome gastrointestinale şi crize convulsive generalizate, halucinaţii, cu recurenţe la câteva zile, atac cerebral, de obicei fără sfârşit letal. Cazurile neletale sunt asemănătoare cu tabes dorsalis*. Nu apar simptome care să sugereze ocluzia vasculară.

* Tabes dorsalis este leziunea produsă de infecţia măduvei spinării cu *Treponema pallidum*. Se caracterizează prin degenerarea neuronilor din coloanele dorsale ale substanţei cenuşii medulare.

Ergotismul gangrenos, produs de *C. purpurea*, se caracterizează prin gangrenarea necrotică a extremităţilor şi simptome gastrointestinale. Alcaloizii produc constricţia vaselor mici. Fluxul sanguin este diminuat sau chiar oprit în extremităţi: picioare, urechi, coadă. Ţesutul ischemic se necrozează. Tulburările sunt mai evidente în sezonul rece. Leziunile se aseamănă cu cele produse de îngheţ. Ultima epidemie majoră de ergotism convulsiv s-a înregistrat în India (1975), produsă de *C. fusiformis*.

Nu se ştie dacă cele două tipuri de manifestări clinice se datorează conţinutului diferit în alcaloizi al celor două specii fungice, proprietăţilor toxice ale alcaloizilor sau nivelului diferit de înglobare a toxinei de diferite specii de animale. Animalele sunt expuse, suplimentar, efectului toxic al scleroţilor de *C. paspali*.

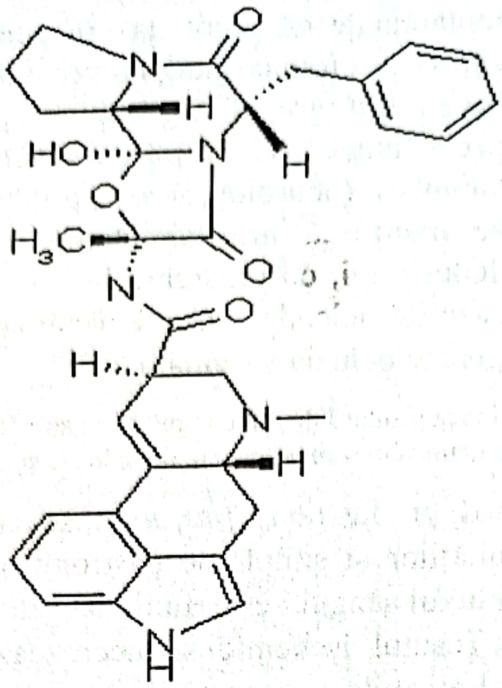
Alcaloizii din ergot variază cantitativ şi calitativ de la un sezon la altul sau de la un an la altul. Conţinutul în alcaloizi este variabil în funcţie de planta-gazdă. Din aceste motive, toxicitatea scleroţilor variază de la un nivel scăzut, la unul mare. Concentraţia în scleroţi, în general, creşte odată cu maturizarea seminţelor. Nivelul contaminării cerealelor cu ergot a fost exprimat în procente de greutate, fără măsurarea cantităţii totale şi individuale de ergoline. Gradul de toxicitate al cerealelor contaminate este dependent de sensibilitatea speciei de animale. Se recomandă ca furajele care conţin mai mult de 0,1% ergot să nu fie utilizate în hrana animalelor.

Ergolinele, în special ergotamina, produc avortul la bovine, iar oile cărora li se administrează ergotamină pe cale orală, reacţionează prin inflamaţie intestinală rapidă.

Omul se expune acţiunii ergolinelor prin consumul pâinii din făina de secară contaminată cu ergot. Tehnologia panificaţiei reduce cantitatea de ergoline din făina contaminată cu 25–100%.

Alcaloizii din scleroţii de *Claviceps purpurea* (ergotamina) pot fi folosiţi pentru tratamentul migrenelor, pentru controlul hemoragiilor postpartum datorită efectului constrictor asupra musculaturii netede a vaselor de sânge, pentru tratamentul unor afecţiuni ale aparatului excretor, reproducător şi ale SNC.

Scanned with OKEN Scanner



Ergotamina

Scleroţii speciilor de *Claviceps* sunt bogaţi în trigliceride, dar puţine specii au acizi graşi specifici care să fie folosiţi pentru identificare. Acidul *ricinoleic* este componentul chimic principal, astfel încât prezenţa *ricinoleatului* într-un aliment este proba directă pentru prezenţa scleroţilor de de *C. purpurea*.

O altă metodă pentru determinarea alcaloizilor ergot de *C. purpurea* în făină este bazată pe cromatografia lichidă, după extracţia din făină cu un amestec de clorură de metil, acetat de etil, metanol şi soluţie de $NH_4OH$ 28%.

Pentru evidenţierea alcaloizilor din ergot în sângele uman, se foloseşte o metodă bazată pe principiul *HPLC*. Probele de plasmă sunt tratate cu amestecul benzen-toluen-acetat de etil-dietilamină. Se separă stratul de solvent şi se evaporă la sec. Metoda detectează concentraţii de 0,2 mg/l de plasmă.

Metoda *RIA*: alcaloizii se conjugă cu albumină serică bovină şi se obţin anticorpi cu specificitate înaltă prin imunizarea iepurelui.

Nu se cunoaşte mecanismul metabolizării alcaloizilor ergot în organismul uman şi animal.

### *Determinarea prezenţei micotoxinelor în substratul contaminat*

Pentru a argumenta cu certitudine că o micotoxină produce efecte toxice la om şi la animalele care au consumat alimentele şi furajele contaminate, este necesară izolarea, purificarea şi cuantificarea toxinei. S-au elaborat metode pentru extragerea, purificarea şi cuantificarea micotoxinelor cu impact major asupra stării de sănătate a omului şi animalelor: aflatoxina, zearalenona, toxina T-2, DAS, DON, ochratoxina

Scanned with OKEN Scanner

A, citrinina, fumonisine, alcaloizii ergot şi alte câteva trichotecene. Pentru ca rezultatele să fie certe, este necesară o expertiză performantă şi echipament tehnic relativ complex, dar testele preliminare pentru evidenţierea prezenţei toxinelor pot fi făcute cu kiturile comerciale disponibile.

Metodele pentru analiza aflatoxinelor sunt de trei categorii:

- inspecţia vizuală a cerealelor pentru identificarea loturilor contaminate;
- metode de screening rapid pentru a determina prezenţa sau absenţa aflatoxinelor;
- metode de laborator pentru cuantificarea cantităţii reale de toxină prin metoda TLC, GLC, HPLC (High pressure liquid chromatography), metoda fluorimetrică cu iod sau testul ELISA.

Zearalenona şi trichotecenele se evidenţiază prin eventuala apariţie a sindromului estrogenic la animalele care au consumat cerealelele infectate, prin refuzul hranei sau emeză. Dacă sunt necesare metode de laborator, se pot folosi TLC, GLC, HPLC şi spectroscopia de masă.

### *Toxine fungice produse în clădirile umede*

Până relativ recent, toxinele microfungilor au fost considerate în primul rând contaminanţi ai alimentelor şi furajelor. Interesul s-a extins pentru studiul îmbolnăvirilor la persoanele expuse la micotoxinele dintr-un amestec de spori ai fungilor care cresc pe pereţii clădirilor umede şi contaminează aerul. Expunerea la microfungii toxici în spaţiile închise se aseamănă mai mult cu expunerea naturală a animalelor decât cu expunerea controlată în laborator. Animalele, în condiţii de laborator, sunt sănătoase, de aceiaşi vârstă, sunt menţinute în condiţii optime şi sunt expuse la doze cunoscute ale unui agent toxigenic. În contrast, în condiţii naturale, animalele au vârste diferite, stări fiziologice diferite, trăiesc adeseori în condiţii nutriţionale suboptimale şi sunt expuse la un amestec de agenţi toxici pe căi multiple.

Creşterea fungilor începe la o *activitate a apei* (aw) de 0,8, dar cantităţi semnificative de micotoxine sunt produse numai când *aw* atinge 0,95.

Producerea substanţelor toxice este influenţată de faptul că fungii cresc în culturi mixte, cu alţi fungi şi bacterii. Materialele construcţiei formează o matrice cu un număr mare de combinaţii de diverse materiale: tapet, ipsos, lemn.

Progresele tehnice oferă o metodologie diversificată pentru testarea existenţei micotoxinelor: TLC (thin layer chromatography), LC (liquid chromatography), GC (gas chromatography), MS (mass spectroscopy).

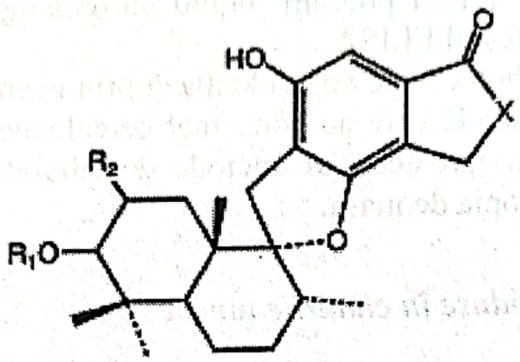
În clădirile umede, genurile care depăşesc nivelul creşterii din mediul extern sunt *Aspergillus, Penicillium, Stachybotrys, Cladosporium*. N-au fost testate toate genurile şi speciile de microfungi pentru producerea toxinelor.

După ce s-a remarcat asocierea dintre creşterea *Stachybotrys chartarum* în clădiri şi hemosideroza idiopatică pulmonară, aceşti fungi filamentoşi au devenit subiectul unor investigaţii intense. Toxicitatea lor este argumentată din punct de

Scanned with OKEN Scanner

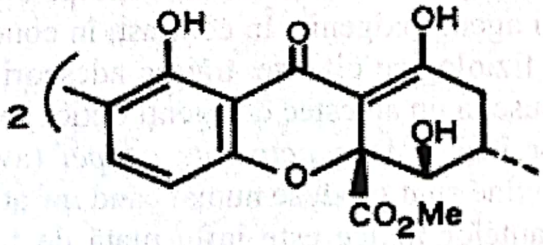
vedere chimic, deoarece biomasa eliberată din materialele infectate cu *Stachybotrys* conţine cantităţi mai mari de metaboliţi secundari decât în cazul altor fungi care cresc pe materialele din zidurile construcţiilor.

*Stachybotrys chartarum* este specia care produce cele mai multe tipuri de toxine citotoxice inhibitoare ale secreţiei proteinelor. Cele mai importante sunt trichotecene macrociclice: satratoxina H, G, F şi izo-F, roridina E şi verucarina J şi B. Toate se sintetizează pe calea sesquiterpenoidelor. *Stachybotrys* creşte în mod obişnuit în zidurile umede care conţin ipsos ($CaSO_4 \cdot 5H_2O$) şi produce *drimani spirociclici*, atranone B şi C sau trichotecene macrociclice.




Fenilspirodrimani
X= O; NH
$R_1$= H, Ac; $R_2$= H, OH, OAc

*Penicillium chrysogenum* este specia cea mai comună dintre microfungi în pereţii clădirilor umede şi produce o singură toxină, acidul *D-secalonic*.




Acidul D-secalonic

*Penicillium polonicum* produce cel puţin 3 tipuri de de compuşi toxici: *verucosidine tremogene*, *acid penicilic* cu efecte citotoxice faţă de macrofagele pulmonare ale rozătoarelor şi *glicopeptide nefrotoxice*, unele implicate în nefropatia endemică specifică regiunii balcanice.

*Penicillium expansum*, izolată din lemnul clădirilor, produce un amestec foarte toxic de patulină, citrinină, chetoglobozină şi roquefortină C.

Patulina este cel mai toxic metabolit produs de *Penicillium*: are efect inhibitor asupra activităţii macrofagelor peritoneale şi măreşte sensibilitatea organismului la infecţiile fungice şi bacteriene.

Scanned with OKEN Scanner

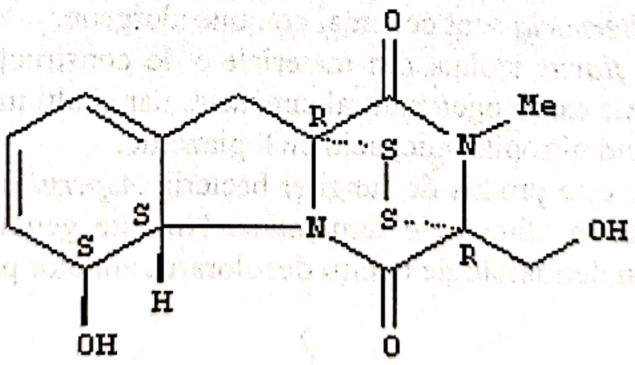
Speciile de *Trichoderma* (*T. harzianum, T. viridae*) produc trichotecene, trichodermol, trichodermina, pirone lactonice cu moleculă mică şi adeseori volatile, *peptide ciclice* (*ciclocloritina*) cu acţiune asupra membranei celulare, proteine citotoxice inactivatoare ale ribosomilor, izonitrili, alţi metaboliţi cu greutate moleculară mică.

*Aspergillus niger* produce *malformina* şi ochratoxina A.

*Aspergillus fumigatus* se izolează frecvent din încăperile igrasioase, în special din praf. Produce un amestec de metaboliţi cu activitate biologică: fumigaclavine, fumitoxine, fumitremogene, *gliotoxine*, veruculogen.

*Veruculogenele* şi toxinele *penitrem* sunt micotoxine tremogene: produc tremur, ataxie, convulsii. Studiile privind efectele acestor toxine s-au făcut după administrare intraperitoneală, care nu are echivalenţă fiziologică şi de aceea rezultatele sunt discutabile.

*Gliotoxina* este produsă de *Alternaria, Trichoderma, Penicillium, Aspergillus fumigatus*. Structural este un compus din familia epipolitiodioxopiperazinei, la care legătura S-S este esenţială pentru activităţile biologice. Speciile de *Alternaria* sunt în special saprobionte, dar unele au dobândit potenţial patogen şi infectează un spectru larg de gazde. Este imunosupresoare şi inductoare a morţii apoptotice în câteva tipuri celulare: celule musculare netede de şobolan, celule stelate ale fibrozei hepatice umane. Efectul imunosupresor marcat este probabil un factor de virulenţă la *Aspergillus fumigatus* şi *Claviceps albicans*, având un rol posibil în aspergiloza şi candidoza invazivă. Toxicitatea acută la şoarece este produsă la doza de 7,8 mg/kg prin injectare intravenoasă şi 32 mg/kg prin injectare intraperitoneală.



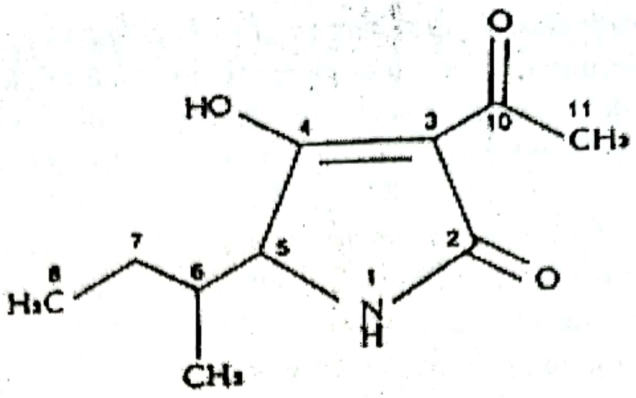

Gliotoxina

*Alternaria tenuis* predomină în zidurile umede şi produce *alternariol*, tentoxina, *acizi tenuasonici* şi alţi metaboliţi necunoscuţi.

*Tentoxina* – un peptid ciclic, induce cloroza la plantulele tinere, imediat după germinare.

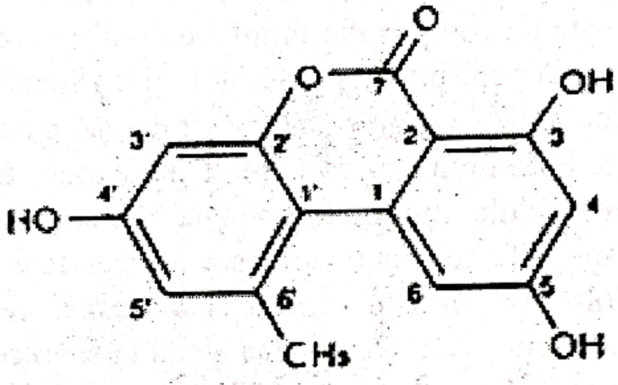
*Acidul tenuasonic* este primul acid tetramic, toxic, identificat la *Alternaria tenuis*.

Scanned with OKEN Scanner



Acid tenuasonic

*Alternariolul* este un compus citotoxic, sintetizat de *Alternaria alternata*. Produce toxicitate acută şi cronică la şoarece, după injectare intraperitoneală.

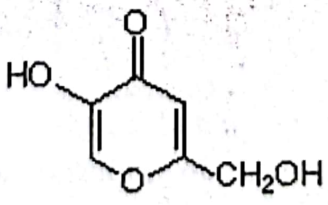


Alternariol

Sporii de *Alternaria* sunt cele mai comune alergene.

*Aspergillus flavus* izolată din materialele de construcţie produce aflatoxina $B_1$, cel mai puternic carcinogen natural cunoscut, dar şi alţi metaboliţi: *acidul kojic*, acid aspergilic, acid nitropiazonic, acid ciclopiazonic.

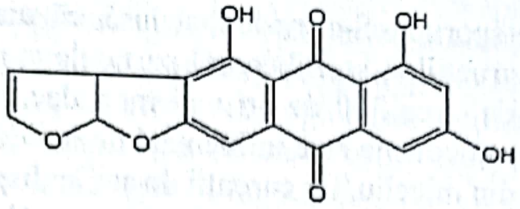
*Acidul kojic* este produs de fungi şi bacterii: *Aspergillus, Penicillium, Acetobacter*. Se găseşte în alimentele fermentate. Nu este genotoxic. Se foloseşte ca agent terapeutic în dermatologie pentru decolorarea zonelor pigmentate.



Acidul kojic

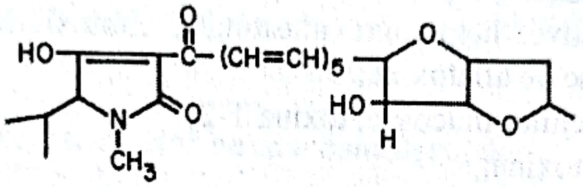
*Aspergillus versicolor* este specia cea mai comună printre fungii care care cresc în pereţii clădirilor umede. Se dezvoltă pe medii foarte sărace în substanţe nutritive şi produce *versicolorine* şi sterigmatocistine.

Scanned with OKEN Scanner



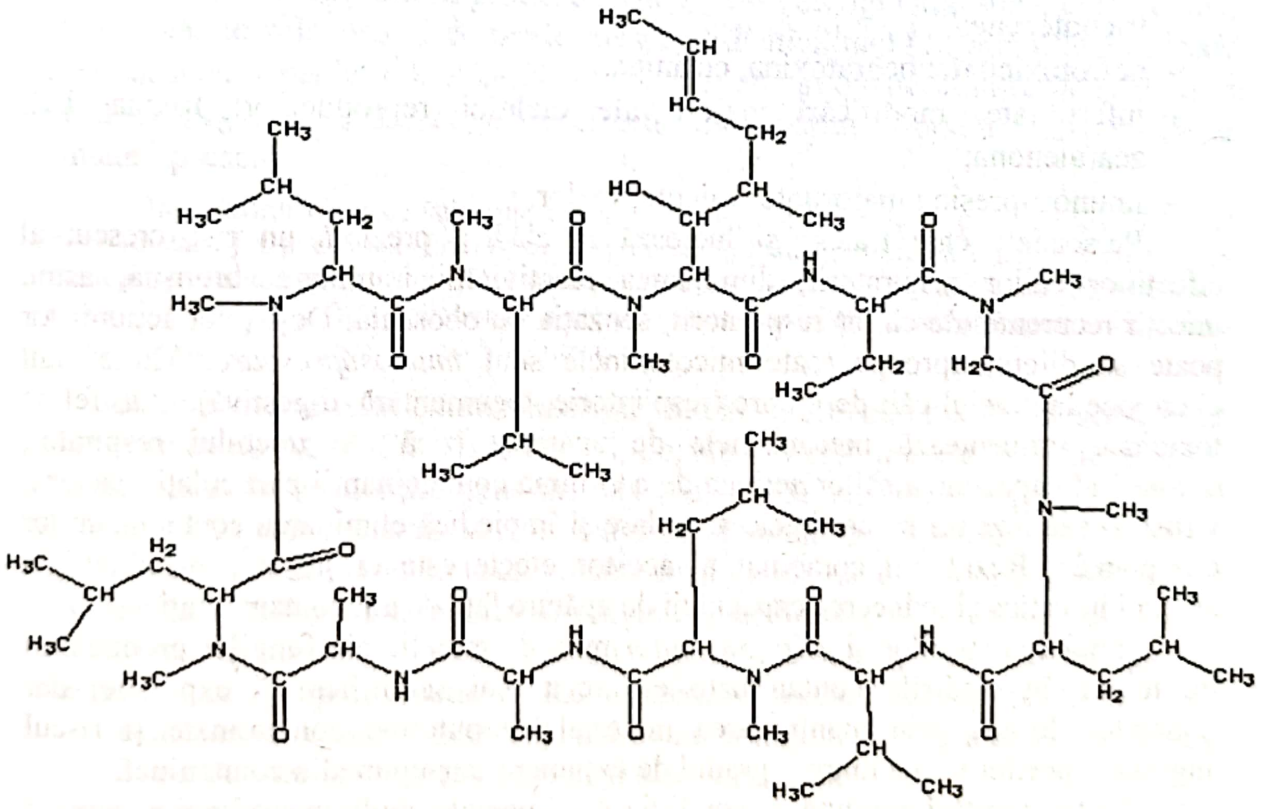
Versicolorina A

*Chaetomium globosum* este cea mai comună specie a genului în clădirile igrasioase. Produce *chetomine* cu efect citotoxic acut şi *chetoglobozine*, inhibitoare ale diviziunii celulare şi transportului glucozei.



Chetoglobozina

*Ciclosporina* produsă de *Tolypocladium inflatum*, este recunoscută pentru efectele sale imunosupresoare.



Ciclosporina A

Până recent s-a presupus că persoanele care trăiesc în clădirile contaminate cu fungi sunt expuse la micotoxine prin inhalarea sporilor şi a fragmentelor mici de

Scanned with OKEN Scanner

miceliu de dimensiunile sporilor. S-a evidenţiat însă, că din coloniile fungice care cresc pe materialele construcţiilor, se eliberează particule mult mai mici decât sporii, de 0,3 µm, cu densităţi de circa 300 de ori mai mari decât ale sporilor. Eliberarea sporilor şi a fragmentelor miceliene este influenţată de umiditate: scăderea umidităţii este favorabilă eliberării din miceliu, iar curenţii de aer le dispersează.

Numeroase studii au evidenţiat efectele adverse ale expunerii la toxinele produse de fungii care cresc în pereţii clădirilor umede.

*Efectele posibile ale expunerii la micotoxinele* multiple din spaţiile închise sunt variate şi se răsfrâng asupra funcţionalităţii tuturor sistemelor de organe:

- creşterea fragilităţii vasculare, hemoragii tisulare, în special pulmonare: aflatoxinele, satratoxina, roridina;
- tulburări digestive, hemoragie intestinală, citotoxicitate hepatică (necroză, fibroză) produse de aflatoxine;
- leziuni ale epiteliilor mucoase: toxina T-2;
- anorexie: vomitoxina;
- disfuncţie respiratorie, hemoragii pulmonare: trichotecene;
- tremur, pierderea coordonării activităţii motorii, depresie, dureri de cap: trichotecene;
- erupţie veziculară eritematoasă (rash), senzaţie de arsură, fotosensibilizare: trichotecene;
- nefrotoxicitate: ochratoxina, citrinina;
- infertilitate, modificări majore ale ciclului reproducător: toxina T-2, zearalenona;
- imunosupresie : majoritatea micotoxinelor.

Persoanele care trăiesc şi lucrează în clădiri, prezintă un risc crescut al infecţiilor căilor respiratorii, diminuarea reactivităţii imunitare, bronşită, astm, infecţii recurente ale căilor respiratorii, senzaţia de oboseală. Deşi ţinta acţiunii lor poate să difere, aproape toate micotoxinele sunt *imunosupresoare*. Multe sunt citotoxice la nivelul căii de intrare (respiratorie, tegumentară, digestivă). O astfel de toxicitate influenţează mecanismele de apărare fizică ale tractului respirator, diminuând capacitatea căilor aeriene de a elimina contaminanţii particulaţi (bacterii, virusuri) sau lezează macrofagele alveolare şi împiedică eliminarea contaminanţilor din plămân. Rezultatul combinat al acestor efecte este creşterea sensibilităţii la agentul infecţios şi reducerea capacităţii de apărare faţă de alţi contaminanţi.

Inhalarea sporilor şi a fragmentelor mici de miceliu ale fungilor producători de toxine în clădirile contaminate este cea mai semnificativă expunere, dar contactul dermic prin manipularea materialelor puternic contaminate şi riscul ingestiei sporilor toxici măresc gradul de expunere într-un mediu contaminat.

La temperaturi crescute, în condiţii experimentale, mulţi microfungi eliberează *compuşi organici volatili* cu greutate moleculară mică: cetone, aldehide, alcooli, substanţe aromatice şi alifatice. Compoziţia lor rămâne constantă pe o mare varietate de medii. Prezenţa unor compuşi marker, comuni mai multor specii, ca de exemplu

Scanned with OKEN Scanner

3-metil furan, poate fi monitorizată ca probă pentru prezenţa fungilor. Metoda a fost propusă pentru monitorizarea contaminării fungice în depozitele de cereale.

Dovezile preliminare sugerează că expunerea la concentraţii mici de compuşi organici volatili poate determina iritarea căilor respiratorii, independent de expunerea la alergenele fungice particulate.

Compuşii organici volatili pot să apară prin efecte metabolice indirecte. Exemplul cunoscut este degradarea fungică a ureii din polimerii sintetici, folosită ca sursă de C şi N. Se formează *formaldehida* ca derivat volatil.

Efectele sinergice, la nivel molecular, ale expunerii simultane la toxine multiple nu sunt cunoscute. Foarte puţin studiate sunt produsele rezultate din degradarea micotoxinelor, în special sub acţiunea agenţilor oxidanţi puternici (hipocloritul de Na, ozonul), agenţi folosiţi în practica sterilizării industriale.

## Interacţiunea micotoxinelor cu macromoleculele

Dintre cele circa 400 micotoxine numai două – aflatoxina şi sterigmatocistina – induc tumori după administrare experimentală la primate. Ele au efecte *genotoxice* directe deoarece interacţionează cu ADN şi formează complexe stabile.

Efectele mutagene sunt produse de aflatoxină, sterigmatocistină, ochratoxină, fumonisină, zearalenonă şi de unele toxine de *Penicillium* (citrinină, luteoskirină, patulină, acidul penicilic). Potenţialul lor malign* se poate manifesta la diferite specii de organisme, dar dovezile directe ale raportului lor cu malignităţile la primate lipsesc.

* Din numărul mare de substanţe chimice carcinogene analizate în perioada '61–'97, unul singur (uretanul) s-a dovedit cancerigen la primate. Zaharina, identificată iniţial ca un agent carcinogen al tractului urinar şi interzisă ca aditiv alimentar, s-a dovedit că nu este carcinogenă pentru primate. La rozătoare, efectul carcinogen s-ar putea datora capacităţii rinichiului acestor specii de a concentra zaharina, care este mai mică la primate.

Natura interacţiunii *aflatoxinelor* cu proteinele este mai puţin cunoscută decât interacţiunea cu ADN. Fracţia histonică, bogată în lizină poate lega aflatoxina $B_1$. Interacţiunea s-a evidenţiat prin metoda dializei la echilibru şi prin măsurarea vâscozităţii. *In vitro*, aflatoxina $B_1$ se leagă cu albumina plasmatică.

Aflatoxina $B_1$ s-a complexat cu compuşii donori de electroni (dimetilanilina, hexametilbenzen) şi cu aminoacizii (triptofan, histidină), printr-o interacţiune cu transfer de sarcină: se pare că în aceste reacţii, aflatoxina $B_1$ are rol de acceptor de electroni. Acelaşi tip de reacţie are loc în interacţiunea cu macromoleculele.

Prin metoda spectrofotometriei s-a demonstrat interacţiunea aflatoxinelor $B_1$, $G_1$ şi $B_2$ cu DN-aza şi creşterea activităţii sale enzimatice.

Efectele aflatoxinei se corelează direct cu inhibiţia sintezei proteinelor. Aflatoxina, *in vivo*, este transformată în compuşi activi care se asociază cu ADN şi ARN şi inhibă activitatea ARN-polimerazei. Astfel este inhibată sinteza ARN şi a proteinelor, în celulele care se divid cu o rată crescută, aşa cum sunt celulele limfoide.

Scanned with OKEN Scanner

Deoarece aflatoxina inhibă semnificativ activitatea ARN-polimerazei, s-a analizat interacţiunea acestei toxine cu ADN, evaluată prin metodele analizei spectrofotometrice şi a dializei la echilibru. După adăugarea ADN la soluţia de aflatoxină $B_1$, la pH neutru, maximul de absorbţie al toxinei s-a modificat de la 360 nm la 368 nm, însoţită de efectul *hipocrom** la 355 nm şi *hipercrom* la 385 nm.

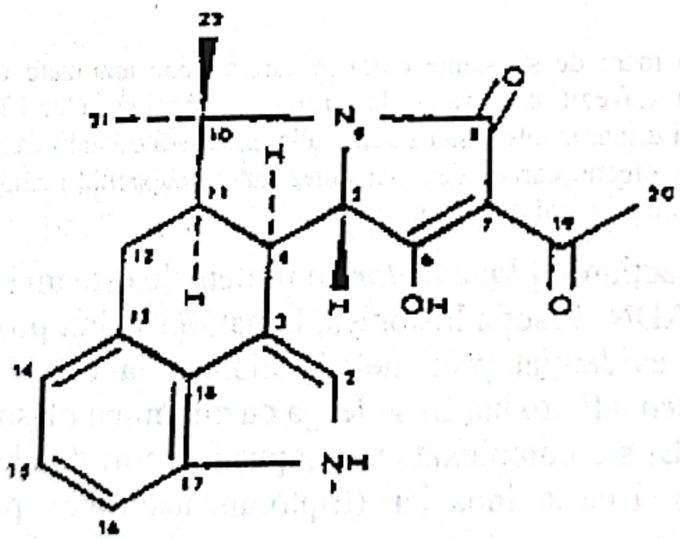
* Efectul hipocrom semnifică scăderea absorbţiei radiaţiei la o anumită lungime de undă, iar efectul hipercrom are semnificaţia creşterii absorbţiei.

Amploarea efectelor hipocrome şi hipercrome se corelează cu gradul legării aflatoxinei $B_1$ cu ADN. Interacţiunea diferitelor aflatoxine cu ADN este maximă pentru $B_1$ şi de mai mică amploare pentru celelalte: $B_1>B_2>M_2>G_1>(G_2, B_{2a}, M_1$ şi $G_{2a})$. Mecanismul interacţiunii *in vivo* poate fi complet diferit de acela al legării *in vivo*. Aflatoxinele s-au legat cu ADN, ARN şi cu fracţiile proteinelor solubile din ficatul, rinichiul, splina şi intestinul de şobolan. Aflatoxina $B_1$ are cea mai înaltă activitate de legare cu proteinele din ficat, iar aflatoxina $G_1$ se leagă cu ARN hepatic. Ambele toxine s-au legat intens cu proteinele din rinichi şi splină.

Aflatoxina $B_1$ nu interacţionează cu ADN din celulele de *Bacillus megatherium*, dar moleculele marcate se regăsesc în protoplastul şi în membrana bacteriei.

Aflatoxina produce efecte toxice asupra celulelor timusului şi atrofiază bursa lui Fabricius la păsări.

*Acidul ciclopiazonic* produce necroza ţesutului limfoid bursal, iar trichotecenele şi în special toxina T-2, induc necroza şi epuizarea limfocitelor din timus şi din ganglionii limfoizi la animalele de laborator, la păsări şi la mamiferele domestice.




Acid ciclopiazonic

Patulina are efecte asemănătoare.

*Trichotecenele* produse de *Stachybotrys* şi *Fusarium* (DAS, DON, fusarenona x), dar în special toxina T-2, aù efecte imunosupresoare. Aceste molecule sunt inhibitori foarte puternici ai sintezei proteinelor. Deoarece blochează sinteza ADN şi ARN pe calea inhibiţiei peptidil-transferazei, pot produce leziuni radiomimetice în celulele care se divid rapid.

Scanned with OKEN Scanner

Toate toxinele care produc efecte imunosupresoare diminuă rezistența față de infecțiile cu *Salmonella, Mycobacterium tuberculosis, Listeria, herpes simplex virus, Candida, Cryptococcus.*

Dozele mici ale unor micotoxine (T-2, citrinină, patulină) au efecte imunostimulatoare: crește numărul celulelor producătoare de anticorpi în splină, sinteza de IgA în splină, reacțiile de hipersensibilitate întârziată, blastogeneza limfocitelor T și B.

*Ochratoxina A* se leagă, *in vitro*, cu câteva proteine: albumina serică bovină, aldolaza, arginaza, trombina, catalaza și cu mitocondriile hepatice, prin interacțiune necovalentă. Nu se leagă cu ADN, ARN și nici cu γ-globulinele. S-a evidențiat o corelație între gradul de toxicitate și rata legării: de exemplu, toxinele mai puternice se leagă mai ferm cu albumina serică bovină, decât toxinele inactivate. Interacțiunea este mediată de legături hidrofobe și ionice.

Metaboliții fungici lactonici cu o dublă legătură nesaturată – *patulina* și *acidul penicilenic* – produși de *Penicillium* și *Aspergillus*, interacționează cu glutationul redus, cu cisteina, cu proteinele alimentare, rezultatul fiind pierderea toxicității acute. S-a sugerat că grupul -SH al compușilor tiol și al proteinelor reacționează cu legătura dublă conjugată față de grupul C=O al lactonei.

Interacțiunea micotoxinelor cu macromoleculele are loc prin formarea *legăturilor covalente*, așa cum sunt cele formate între metaboliții aflatoxinei $B_1$ cu ARNt și cu proteinele sau ale patulinei și acidului penicilic cu grupările tiol ale câtorva enzime și aminoacizi. Legarea *necovalentă* caracterizează interacțiunea ochratoxinei A cu albumina serică, a aflatoxinelor cu acizii nucleici și cu proteinele sau a furocumarinelor cu ADN.

*Metabolismul lipidic* este foarte important, deoarece, în funcție de specie, între 40–95% din totalul biosintezei lipidelor are loc în ficat și produșii sunt apoi transportați la situsurile de utilizare. De aceea, evaluarea cantitativă a lipidelor hepatice este un indicator sensibil al perturbării metabolismului acestor substanțe.

Aflatoxinele modifică metabolismul *lipidic* al organismului intoxicat. Afirmația este sprijinită de creșterea conținutului lipidic în ficatul de porc, bovine, șobolan, șoarece, câine, pisică, cobai, maimuță, om, păsări. Oaia este foarte rezistentă la aflatoxine. Aflatoxinele inhibă sinteza fosfolipidelor în ficatul de șobolan. După administrarea cantităților multiple subletale de toxină, în ficatul de rață se acumulează lipidele, iar rata încorporării glucozei marcate radioactiv în lipidele hepatice scade. Compușii lipotropi din dietă împiedică formarea ficatului gras : metionina, vitamina $B_{12}$, acidul folic, colina.

Ochratoxina A și luteoskirina produc ficatul gras la rață, șobolan și oaie.

Unele micotoxine influențează celulele hematopoetice: de exemplu, trichotecenele produc stachibotriotoxicoza equinelor; aleukia toxică alimentară (ATA) produsă de speciile de *Fusarium*; pancitopenia, consecutivă ingestiei toxinelor de *Stachybotrys chartarum.*

Micotoxinele se leagă cu unele componente structurale ale mitocondriilor. Afirmația s-a bazat pe faptul că unele micotoxine inhibă respirația mitocondrială.

Scanned with OKEN Scanner

Astfel, ochratoxina A inhibă neselectiv, dar competitiv, procesele de transport membranar al mitocondriilor.

Fungii sunt sursă de medicamente imunosupresoare (ciclosporina), iar speciile de *Stachybotrys* produc un compus imunosupresor asemănător ciclosporinei, care prelungeşte perioada de respingere a grefei de piele la şobolan.

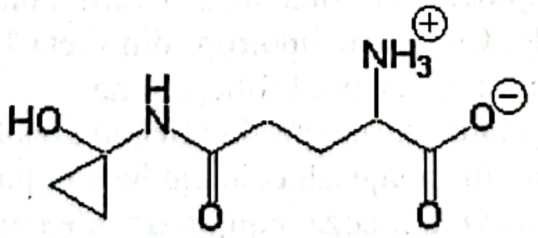
### Toxine produse de macromicete

Macromicetele toxice constituie o problemă de sănătate publică, datorită accidentelor consecutive consumului. Rata morţii persoanelor intoxicate după consumul macromicetelor producătoare de toxine este 2–4%. Manifestările acute apar după 6–24 de ore: o stare de rău general, vomă, hipovolemie. După 5–7 zile, de cele mai multe ori se produce hepatita, deoarece ficatul este organul ţintă primar al acţiunii toxinelor ingerate. În forma severă a intoxicaţiei pot apărea methemoglobinemia şi hemoliza. În funcţie de efectele produse asupra organismului şi de structura chimică, toxinele produse de macromicete s-au împărţit în 7 grupe:

Grupa 1:
- toxine heptapeptidice ciclice: *faloidine, falotoxine*;
- toxine octapeptidice: *amatoxine*.

Grupa 2:
- *monometil hidrazina* (MMH), inhibitor al piridoxal-fosfatului, coenzimă a multor sisteme enzimatice;
  piridoxina (vitamina $B_6$) împiedică efectul inhibitor al MMH faţă de piridoxal-fosfat;
- *giromitrina*. Cele două toxine sunt produse de *Gyromitra esculenta, Gyromitra gigas*.
- *orelanina*, produsă de macrofungii din genul *Cortinarius*.

Grupa 3:
- *toxinele* produse de *Coprinus atramentarius*. Coprina are efectul „antiabuz", ca şi disulfiram.



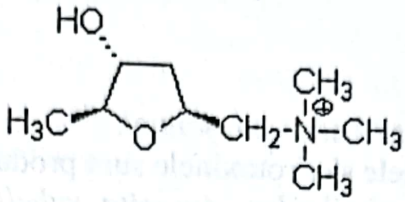

Coprina

Coprina interferă cu degradarea enzimatică a alcoolului, prin inhibarea acetaldehid-dehidrogenazei. Astfel în organism se acumulează acetaldehida.

Scanned with OKEN Scanner

Grupa 4:

– *muscarina*, produsă de *Boletus calopus, Boletus luridus, Boletus satanas, Amanita muscaria* etc.

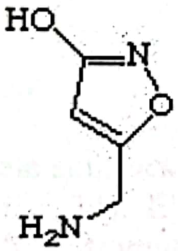


Muscarina

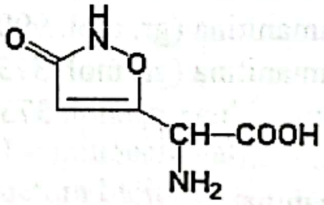
Toxina produce hiperactivitate parasimpatică, bradicardie, bronchospasm, salivație, lăcrimare, mioză, vomă, atac cerebral. Simptomele durează 2–3 zile. In cele mai multe cazuri are loc recuperarea. Mortalitatea este de până la 5%. Remediul este *atropina*.

Grupa 5:

– *muscimol/acidul ibotenic*. Toxinele sunt produse de *Amanita muscaria, Amanita pantherina*. În cercurile religioase, asiaticii ingeră deliberat *Amanita* pentru efectele psihotrope.



Muscimol



Acid ibotenic

Simptomele apar în 30 de minute după consum: euforie, confuzie mentală, excitație, halucinații, urmate de o stare de oboseală, insomnie. Efectele durează mai puțin de 12 ore.

Grupa 6:

– *psilocibina* şi *psilocina* produse de *Psylocybe mexicana, P. cubensis*. Sunt toxine psihotrope, folosite de indigenii americani în timpul ceremoniilor religioase. Simptomele apar după 30–60 de minute: euforie, tahicardie, hiperexcitabilitate, stare de rău general, vomă.

Grupa 7:

– *toxine iritante* pentru tractul gastrointestinal. Efectele au intensități foarte variate în funcție de sensibilitatea individuală. Recuperarea este completă.

Cele mai multe intoxicații se datorează ingestiei macromicetelor producătoare de toxine din genul *Amanita*. 8 specii ale genului *Amanita* produc toxine care periclitează viața.

Scanned with OKEN Scanner

Toate toxinele produse de speciile g. *Amanita* sunt *peptide ciclice*. Diferitele specii ale genului *Amanita* produc următoarele *grupe de toxine:*

– *amatoxine;*
– *falotoxine;*
– *virotoxine;*
– *falolisine;*
– *acidul ibotenic* şi derivatul său – *muscimol.*

Amatoxinele, falotoxinele şi virotoxinele sunt produse de *Amanita bisporigena, Amanita ocreata, Amanita phalloides, Amanita suballiacea, Amanita tenuifolia, Amanita virosa* etc. Unele specii de *Amanita* produc falotoxine şi virotoxine cu acţiune rapidă, ce duc la moarte după 2–5 ore după injecţie intravenoasă la animalele de experienţă, dar necesită doze mai mari decât amatoxinele.

Falolisinele formează un grup de toxine descoperite recent numai la *A. phalloides*.

Acidul ibotenic este produs de *Amanita cothurnata, Amanita muscaria* şi *Amanita pantherina.*

Cele mai reprezentative, cu cea mai largă răspândire, sunt *amatoxinele* şi *falotoxinele*. Ambele grupe de substanţe sunt toxine foarte puternice după injectare intravenoasă la animale. Falotoxinele nu sunt active după ingestie. Numai amatoxinele sunt implicate în intoxicaţiile cu *Amanita.*

S-au identificat *9 amatoxine*:

– α-amanitina (gr. mol. 990 Da);
– β-amanitina (gr. mol. 373 Da);
– γ-amanitina (gr. mol. 373 Da);
– ε-amanitina;
– amanina;
– amanin-amida (numai la *Amanita virosa*);
– amanulina;
– acidul amanulinic;
– proamanulina.

Amatoxinele sunt singurele inductoare ale intoxicaţiilor umane cu sfârşit letal. Sunt octapeptide biciclice, mult mai puternice decât alte toxine. Se acumulează în ficat şi produc leziuni, de unde sunt secretate prin bilă în sânge, fiind reluate de ficat. Astfel, realizează un ciclu al leziunilor şi al excreţiei.

*Falotoxinele* naturale sunt în număr de 7:

– faloina;
– faloidina;
– falisina;
– profaloina;
– falacina;
– falacidina;
– falisacina.

Scanned with OKEN Scanner

Toate falotoxinele sunt derivate din acelaşi peptid ciclic alcătuit din 7 aminoacizi. Sunt două grupe de falotoxine: neutre şi acide. Cele neutre conţin D-treonina, iar cele acide conţin acidul β-hidroxisuccinic.

Sunt 6 variante chimice de *virotoxine*:

- viroidina ;
- desoxiviroidina;
- alfa 1 – viroidina;
- alfa 1 – desoxiviroidina;
- viroisina;
- desoxiviroisina.

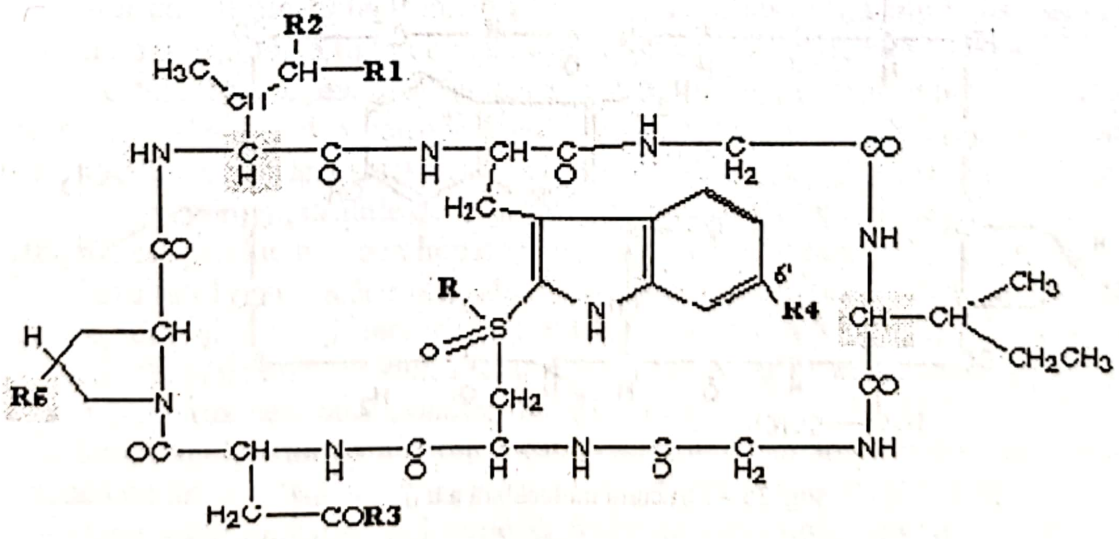
Virotoxinele sunt heptapeptide monociclice, au efecte toxice asemănătoare şi probabil sunt derivate din falotoxine.

*Falolisinele*, în număr de 3, sunt proteine hemolitice, dar sunt termo- şi acidolabile şi consumul ciupercilor producătoare nu reprezintă un factor de risc pentru starea sănătăţii.

*Acidul ibotenic* este un aminoacid excitator (favorizează propagarea potenţialelor de acţiune), iar *muscimol* este derivatul său. Aceşti compuşi acţionează asemănător cu mediatorii sinaptici naturali ai neuronilor SNC: *acidul glutamic* şi *acidul aspartic*. Cele două toxine pot produce moartea selectivă a neuronilor ai căror mediatori sunt cei doi aminoacizi excitatori.

### *Amatoxinele*

Amatoxinele sunt *octapeptide biciclice*, cu un rest de Trp legat în poziţia 2 a inelului indol (fig. 34). Ele constau exclusiv din L-aminoacizi şi glicină. Sunt produse de specii de *Amanita, Lepiota, Galerina*. Structura biciclică şi un grup OH




= Situsuri de legare

Fig. 34 – Structura chimică generală a amatoxinelor (după Wieland, 1986).

funcţional la inelul pirolidinic condiţionează toxicitatea. Activitatea lor este dependentă de natura biciclică a moleculei. Hidroliza oricărei legături a structurii biciclice inactivează toxina (Wieland, 1986).

Amatoxinele conţin 3 sau 4 molecule de apă de cristalizare.

În tabelul următor sunt redate grupele R ale amatoxinelor naturale (după Wieland, 1986). *Apare numai la *Amanita virosa*.

| Denumirea toxinei | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 |
|---|---|---|---|---|---|
| α- amanitina | $CH_2OH$ | OH | $NH_2$ | OH | OH |
| β- amanitina | $CH_2OH$ | OH | OH | OH | OH |
| γ- amanitina | $CH_3$ | OH | $NH_2$ | OH | OH |
| δ- amanitina | $CH_3$ | OH | OH | OH | OH |
| Amanina | $CH_2OH$ | OH | OH | H | OH |
| Amanin amida* | $CH_2OH$ | OH | $NH_2$ | H | OH |
| Amanullina | $CH_3$ | H | $NH_2$ | OH | OH |
| Acidul amanulinic | $CH_3$ | H | OH | OH | OH |
| Proamanulina | $CH_3$ | H | $NH_2$ | OH | H |

Amatoxinele produc intoxicaţia letală la om, deoarece sunt foarte active după ingestie, sunt termo- şi acidostabile. *Amanita* sintetizează predominant α-amanitina (fig. 35) şi provoacă un somn profund la 20 de minute după ingestie. În acest interval, halucinaţiile sau starea euforică sunt dominante.

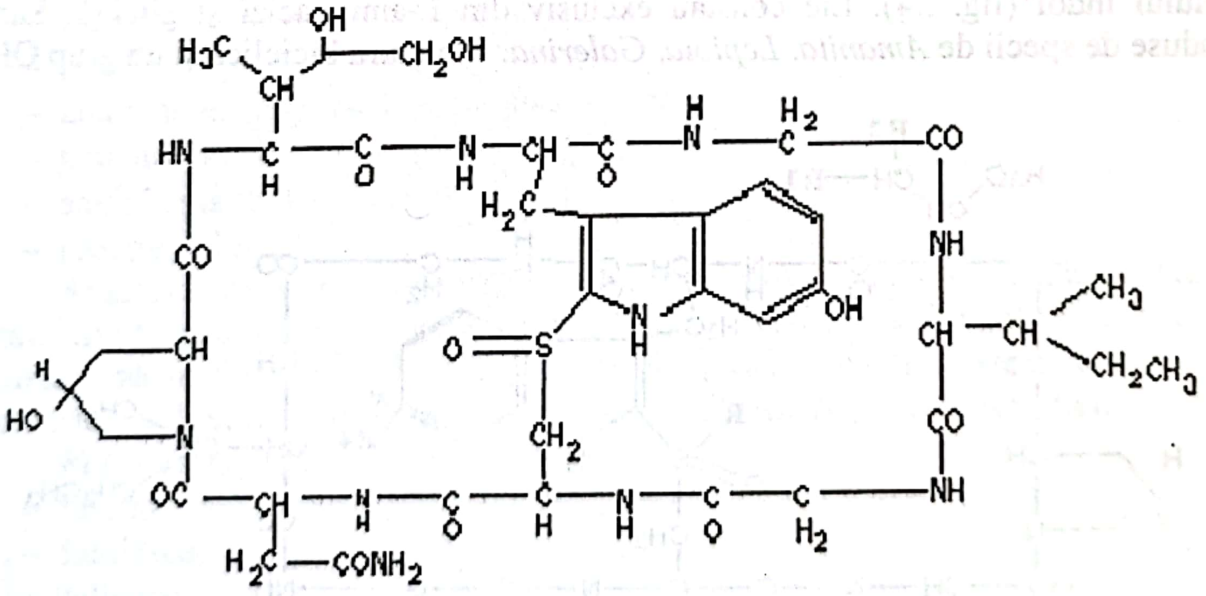


Fig. 35 – Structura moleculară a α-amanitinei.

Peptidele ciclice fungice nu sunt hidrolizate de enzimele gastrice sau intestinale ale mamiferelor şi sunt uşor absorbite la nivel intestinal. Amatoxinele

sunt liposolubile şi pot traversa uşor membranele, având rate diferite de absorbţie, în funcţie de natura grupelor laterale ataşate.

Transportul transepitelial este dependent de energie şi este mediat de două proteine (48 şi respectiv 53 kDa), aceleaşi care au rol în transportul sărurilor biliare. În condiţiile intoxicaţiei cu amatoxine, fluxul biliar continuă şi elimină rapid toxinele în sânge, de unde sunt recirculate în ficat. De aceea, înglobarea amatoxinelor poate fi diminuată prin administrarea *antamanidei*, având rol protector pentru ficat şi rinichi.

După ingestie, amatoxinele sunt absorbite rapid şi s-au detectat în urină chiar la 90–120 min. Concentraţia sanguină a amatoxinei scade repede. La om, în mod excepţional, se regăsesc în plasmă la 36–48 ore după intoxicaţie, numai în cazurile de insuficienţă renală. Nu se metabolizează, dar studiile cu amatoxină marcată radioactiv la câine au evidenţiat că se elimină în cea mai mare parte prin urină şi circa 10% prin secreţia biliară. Toxina eliminată prin secreţia biliară poate fi reabsorbită prin circulaţia enterohepatică. Nivelul cel mai înalt de toxină se găseşte în lichidul gastroduodenal. Circuitul enterohepatic al toxinei ar putea avea implicaţii terapeutice.

*Patogeneză.* Celulele care tapetează căile de transport suferă leziuni toxice. În timp ce sunt absorbite, amatoxinele interferă cu sinteza proteinelor în celulele mucoasei intestinale. Rata înglobării în hepatocite este cea mai înaltă şi ficatul este principala ţintă. Toxina nu este iritantă şi nu apar semne clinice gastrointestinale.

Amatoxinele se concentrează în celulele hepatice şi renale. Efectul citopatologic iniţial constă în fragmentarea nucleolului la 30 de minute după administrare. Cromatina intranucleolară se condensează şi efectul este inhibiţia sintezei proteinelor, urmată de schimbări structuale în citoplasmă şi necroză rapidă.

Toxicitatea crescută se constată după formarea *conjugatelor amatoxine-proteine*, datorită schimbării ţintei celulare. Celulele parenchimale ale ficatului şi rinichiului constituie ţinta legării amatoxinelor cu moleculă mică, iar conjugatele macromoleculare au ca ţintă celulele epiteliale ale sinusoidelor hepatice.

Efectele toxice asupra celulelor epiteliale ale tubilor renali proximali se datorează reabsorbţiei amatoxinelor, ca factor important al nefrozei. Cele mai sensibile sunt celulele care se multiplică cu o rată înaltă, în primul rând celulele mucoasei intestinale, urmate de hepatocite şi de celulele epiteliale ale tubilor renali. Amatoxinele produc necroza hepatocitelor şi a celulelor renale.

Rezultatul intoxicării cu *Amanita* depinde de cantitatea de amatoxine ingerate, dar şi de alţi factori: greutatea corporală a victimei, vârsta şi starea generală de sănătate. *Amanita* conţine un alcaloid – *muscarina* şi alte două halucinogene toxice – *muscimol/acidul ibotenic*.

Simptomele clinice ale intoxicaţiei se manifestă în faze succesive după o perioadă de latenţă de 6–12 ore, deoarece amatoxinele acţionează lent:

– *faza gastrointestinală* începe la 6–24 de ore după ingestie şi durează 2–3 zile. Se caracterizează prin diaree intensă, asemănătoare celei holerice, vomă, dureri abdominale severe, hipoglicemie. În această fază se poate produce

Scanned with OKEN Scanner

deshidratarea accentuată cu hemoconcentrare şi şoc hipovolemic, care amplifică procesul patologic, iar hipocalemia este comună. Hipoglicemia este rezultatul dezechilibrului dintre glicogenoliză şi gluconeogeneză. Pierderea masivă a fluidului poate duce la insuficienţă renală;

- *o perioadă de recuperare aparentă;*
- *faza hepatică* începe la 36–48 de ore după ingestia toxinei, cu insuficienţă hepatică şi icter. Severitatea simptomelor gastrointestinale diminuă, dar sunt afectate organele şi ţesuturile cu turnover celular rapid, datorită inhibiţiei transcrierii. Se produc leziuni hepatice, renale, coagularea sanguină este perturbată sever şi pot apărea sângerări interne;
- *faza de instalare a comei*, datorită insuficienţei funcţionale progresive a ficatului şi rinichiului.

Nivelul seric al *glutamat-oxaloacetat transferazei* (GOT), *glutamat-piruvat tranferazei* (GPT), *lactat-dehidrogenazei şi bilirubinei* creşte pe măsură ce leziunile hepatice progresează, la 2–3 zile după ingestie. În ultimul stadiu al intoxicaţiei, nivelul enzimelor hepatice în ser continuă să crească şi poate duce la encefalopatie şi comă, datorită insuficienţei hepatice. Cea mai gravă leziune este *necroza hepatică,* asociată cu icter şi hepatamegalie. Concomitent, nivelul creatininei şi ureii creşte, datorită leziunilor hepatice şi insuficienţei renale. Indivizii intoxicaţi mor în comă hepatică, asociată cu insuficienţă renală, la 6–12 zile după ingestia ciupercii.

În intoxicaţia severă, hepatita are o evoluţie fulminantă, cu icter marcat, comă hepatică, sângerare internă, anurie prin insuficienţă renală şi colaps cardiovascular. Dacă leziunile sunt reversibile, recuperarea funcţională e lentă.

Doza letală pentru om, estimată din intoxicările accidentale, este sub 0,1 mg/kg corp, o cantitate care se găseşte într-o singură ciupercă de circa 20 g.

Deshidratarea, hipovolemia şi hemoconcentraţia, datorate fazei intestinale a intoxicaţiei, necesită monitorizarea continuă a parametrilor vitali şi corectarea dezechilibrului hidro-electrolitic.

La câine, intoxicaţia experimentală cu amanitină produce hiperglicemie, urmată de hipoglicemie. Moartea animalelor intoxicate survine după 1–2 zile. Administrarea glucozei prelungeşte durata de supravieţuire. Cauza morţii este hemoragia severă în organele interne.

Insuficienţa hepatică se reflectă în dezordinile coagulării.

### *Mecanismul acţiunii amatoxinelor*

*α-amanitina* din *Amanita phalloides* şi *Amanita bisporigena*, la concentraţii foarte mici inhibă necompetitiv dar complet ARN-polimeraza II, însă nu influenţează activitatea ARN-polimerazei I şi III*.

**ARN-polimeraza I* este localizată în primul rând în nucleol şi catalizează sinteza ARNr. ARN-polimerazele II şi III sunt localizate în nucleoplasmă şi catalizează sinteza ARNm şi respectiv ARNt.

Scanned with OKEN Scanner

α-amanitina inhibă sinteza unei clase de ARN (hnRNA), cu dimensiuni heterogene şi cu localizare nucleară.

*ARN-polimeraza II* catalizează sinteza ARNhn şi a ARNm.

*ARN-polimeraza III* catalizează sinteza ARNt şi ARNr 55S şi este inhibată de α-amanitină la concentraţii de 1000 de ori mari decât cele inhibitorii pentru ARN-polimeraza II.

ARN-polimerazele din celulele procariote şi din macrofungii care sintetizează amatoxine sunt insensibile la acţiunea acestor toxine. Plantele sunt mai puţin sensibile la acţiunea inhibitorie a amatoxinelor. Celulele mamiferelor şi insectelor sunt foarte sensibile, dar sensibilitatea variază de la o specie la alta.

Amatoxinele blochează translocaţia ARN-polimerazei II de-a lungul matriţei de ADN, după formarea primei legături fosfo-diesterice. Efectul inhibitor se datorează legării specifice a toxinei de situsul reactiv al ARN-polimerazei II. Inhibiţia ARN-polimerazei III este de scurtă durată (câteva ore). ARN-polimeraza I este insensibilă la acţiunea amatoxinelor. α-amanitina nu interacţionează cu ADN.

Constantele de legare cu efecte inhibitorii variază la diferite toxine naturale, în funcţie de lanţul lateral din poziţia 3. Legarea maximă se produce în prezenţa a 4 atomi de C şi cel puţin a unui grup OH, sugerând că legarea implică formarea legăturilor de H şi interacţiuni hidrofobe.

Legarea amatoxinei la ARN-polimeraza II se face la 3 situsuri: L-izoleucina hidroxilată în poziţia 3, izoleucina în poziţia 6 şi grupul 4-OH al prolinei în poziţia 2. Legarea are loc la subunitatea de 140 kDa a ARN-polimerazei II. Tulpinile mutante de *Drosophila melanogaster* conţin polimeraze rezistente la amatoxine, datorită modificărilor celei mai mari subunităţi (220 kDa).

Recent s-au propus alte mecanisme ale acţiunii toxice: α-amanitina acţionează sinergic cu citokinele endogene (TNF) şi poate produce leziuni celulare prin inducerea apoptozei.

Amatoxinele traversează placenta la o concentraţie suficientă pentru a induce apariţia leziunilor hepatice fetale. Sunt excretate în secreţia lactată.

În prezent nu există un antidot eficient pentru amatoxine, deşi uneori a fost folosit *acidul thioctic*. Cea mai importantă măsură în tratamentul intoxicaţiei cu *Amanita* este declanşarea reflexului de vomă, pentru a elimina sursa de toxine din stomac şi intestin, dar datorită perioadei lungi de latenţă, toxinele se absorb înainte de declanşarea simptomelor. Administrarea laxativelor (sulfat de Mg – 5 g la fiecare 6 ore, lactuloza – 30 g la fiecare 6 ore) şi a agenţilor absorbanţi (cărbune activat), poate favoriza eliminarea toxinelor care au rămas în tubul digestiv, iar hemodializa se poate folosi pentru curăţirea sângelui. Eliminarea toxinei poate fi accelerată prin stimularea diurezei cu furosemid intravenos, cu un randament al urinii de peste 300 ml/h.

Farmacoterapia poate include doze mari de silimarină, penicilină ($10^6$ U/kg/zi), acid thioctic (300 mg/kg/zi) şi *antamanidă* (de 10 ori mai eficientă decât penicilina).

Scanned with OKEN Scanner

Toate sunt hepatoprotectoare, acţionând prin inhibiţia pătrunderii amatoxinelor în celula hepatică.

*Antamanida* este un decapeptid izolat din *Amanita phalloides*. Experimental, s-a demonstrat că previne moartea şoarecelui alb, după administrarea unei doze letale de amatoxină.

Într-un studiu cu 205 cazuri de intoxicaţie în Europa ('71–'80), mortalitatea a fost de 22,4%. La copiii sub 10 ani, rata mortalităţii este de 51,3%. La persoanele netratate, mortalitatea este de 50% şi de 5% la cei cu îngrijire medicală intensivă.

Cea mai eficientă metodă este prevenirea intoxicaţiei prin detectarea prealabilă a toxinei. Culegătorii amatori pot confunda uşor *Amanita* cu ciupercile comestibile, dar confuzia poate fi evitată printr-o reacţie de culoare.

*Testul Melxner* se bazează pe o reacţie de culoare catalizată de HCl, a *ligninei cu amatoxinele* şi este orientativă pentru a determina prezenţa amatoxinei: piciorul sau pălăria ciupercii se presează pe hârtie. După uscare, se adaugă o picătură de HCl concentrat. Prezenţa amatoxinei este indicată de apariţia culorii albastre în 5–10 minute. Testul nu furnizează rezultate certe şi nu poate fi folosit pentru a determina cu certitudine dacă o ciupercă este comestibilă.

### *Falotoxinele*

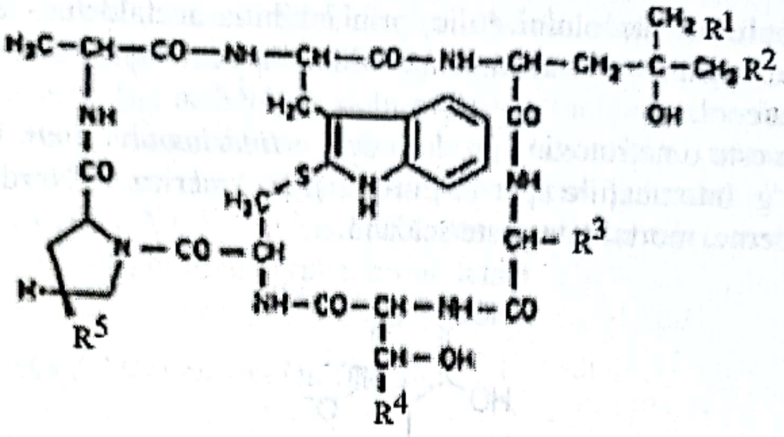
*Falotoxinele* sunt *heptapeptide* biciclice (fig. 36). Greutăţile moleculare sunt de 879, 863 şi 895 pentru faloidină, faloină şi respectiv falisină. Ca şi amatoxinele, falotoxinele sunt termostabile. Nu se distrug prin uscare şi rămân potente în ciupercile depozitate pentru perioade de ordinul anilor. Nu se absorb din tractul intestinal la animalele de experienţă şi probabil nici la om. După administrare parenterală la animale de laborator, falotoxinele distrug reticulul endoplasmic şi mitocondriile şi induc necroza hepatocitelor. Faloidina se cuplează cu actina G (globulară) a membranei, o polimerizează ireversibil în actina F (fibroasă), mărind permeabilitatea membranei plasmatice a hepatocitelor.

Una dintre cele mai importante specii de *Amanita* este *A. muscaria*. Culoarea este variată: galbenă, oranj, roşie. *Amanita muscaria* conţine cantităţi mici de toxină – *muscarina* – care produce contracţia pupilei, vedere confuză, delir, lăcrimare, salivaţie, reducerea ratei pulsului, scăderea presiunii sanguine şi respiraţie de tip astmatic.

Toxinele de *Amanita muscaria* au proprietăţi halucinogene. Muscarina este probabil cel mai vechi halucinogen cunoscut. Mecanismul acţiunii psihotrope a toxinelor nu este cunoscut, dar s-ar putea datora acidului *ibotenic* (un aminoacid) şi a derivatului său, alcaloidul *muscimol*. Alcaloidul muscimol este eliminat prin urină, fără să fie modificat.

Alte specii toxice, potenţial letale după ingestie, sunt *Amanita phalloides, Amanita ocreata, A. pantherina*.

Scanned with OKEN Scanner



| Compuşi | Substituenţi | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $R^1$ | $R^2$ | $R^3$ | $R^4$ | $R^5$ | $LD_{50}$ (mg/kg) |
| Faloidină | OH | H | $CH_3$ | $CH_3$ | OH | 2,0 |
| Faloină | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | OH | 1,5 |
| Profalină | H | H | $CH_3$ | $CH_3$ | H | 100 |
| Falisină | OH | OH | $CH_3$ | $CH_3$ | OH | 2,5 |
| Falacină | H | H | $CH(CH_3)2$ | COOH | OH | 1,5 |
| Falacidină | OH | H | $CH(CH_3)2$ | COOH | OH | 1,5 |
| Falisacină | OH | OH | $CH(CH_3)2$ | COOH | OH | 4,5 |

Fig. 36 – Structura chimică a falotoxinelor produse de *Amanita phalloides* (după Vetter Janos, Toxicon, 1998).

Moleculele modificate chimic, de origine fungică, sunt instrumente foarte utile în cercetarea biologică şi biomedicală. De exemplu, peptidele ciclice produse de *Amanita phalloides* – *falotoxinele* – formează complexe specifice şi stabile cu *actina filamentoasă*. Cuplarea falotoxinelor cu grupări fluorescente (fluoresceina, rhodamina sau cumarina, cu denumirea comercială FITC -faloidinizothiocianat), permite utilizarea lor ca probe pentru identificarea *filamentelor de actină* în celulă. Celălalt grup de peptide ciclice – *amatoxinele* – au specificitate înaltă de legare pentru *ARN-polimeraza II* din toate celulele eucariote şi pot fi folosite ca inhibitori specifici ai transcrierii. Acest mod de acţiune determină o moarte lentă a celulei intoxicate, dar ARN-polimeraza speciei producătoare nu este modificată.

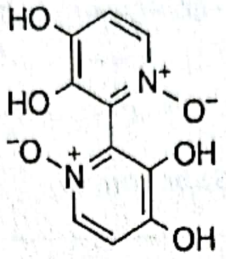
Toxinele produse de speciile genului *Amanita* au activitate hemolitică *in vitro*.

*Coprinus atramentarius* este comestibilă, dacă consumul ei nu se asociază cu ingestia alcoolului. Asocierea cu alcoolul produce tulburări gastrointestinale. Substanţa – *coprina* – a fost izolată. Simptomele produse de intoxicaţia cu coprina sunt asemănătoare cu cele produse de alcoolul consumat după tratamentul cu *disulfiram*, un compus folosit în tratamentul alcoolicilor: coprina inhibă cea de a II-a

Scanned with OKEN Scanner

treaptă a metabolizării alcoolului etilic, prin inhibiţia acetaldehid-dehidrogenazei hepatocitelor. În organism se acumulează aldehida acetică, ce determină refuzul consumului de alcool.

*Orelanina* este o nefrotoxină produsă de *Cortinarius orellanus*, într-o concentraţie de 14 mg/g. Intoxicaţiile apar în Europa şi în America de Nord. În condiţiile nefrologiei moderne, mortalitatea este scăzută.

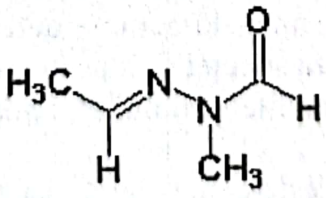



Orelanina

*Mecanismul* acţiunii toxice pare a fi inhibiţia sintezei proteinelor, ARN, ADN, dedusă prin studii *in vitro*. *In vivo*, toxicitatea s-ar datora unui metabolit rezultat din oxidarea orelaninei: un radical anionic (ortosemiquinona) induce formarea radicalilor $O_2$ şi epuizarea rezervelor de glutation şi ascorbat. Oxidarea orelaninei în ţesutul renal poate acumula compuşi chinonici care se leagă covalent cu structurile biologice, ducând la leziuni celulare. Toxina se acumulează şi rămâne legată de rinichi: s-a găsit în biopsiile renale în intervalul 9–60 de zile după consumul macromicetelor toxice. Analiza urinii a fost negativă, ceea ce denotă fixarea fermă a toxinei în ţesutul renal.

Simptomele leziunilor renale apar la 2–4 sau chiar 14 zile după intoxicaţie. În acest interval, unii pacienţi au simptome gastrointestinale: stare de rău general, vomă, diaree sau constipaţie, senzaţia de sete intensă, poli- sau oliguria şi dureri abdominale. Pacienţii resimt intoxicaţia după două zile, când insuficienţa renală deja s-a instalat. Recuperarea este lentă şi riscul fatal al insuficienţei renale este evident. Insuficienţa renală necesită dializă sau transplant.

Unele specii de *Gyromitra* sunt toxice şi produc *giromitrina*, iar altele sunt netoxice, dar ocupă acelaşi areal. Toxina este solubilă în apă şi volatilă şi de aceea fierberea sau uscarea pe termen lung permite ingestia fără riscuri majore de intoxicare.




Giromitrina

O sursă importantă de intoxicaţie este insuficienta detoxifiere prin preparare. Intoxicaţia gravă şi fatală este rară. După ingestie, giromitrina (acetaldehid-formil-metil-hidrazina) este rapid hidrolizată în stomac şi rezultă hidrazine care trec în sânge:

Scanned with OKEN Scanner

metil-formil-hidrazina şi monometil-hidrazina. Hidrazinele sunt mai puţin toxice decât amatoxina şi orelanina, dar sunt iritante pentru mucoase. Ele reduc conţinutul de piridoxină (vitamina $B_6$) al SNC şi sinteza GABA (acidul gama-amino-butiric – un mediator sinaptic), diminuă cantitatea de glutation din eritrocite şi lezează macromoleculele în ţesutul hepatic, probabil prin intermediul radicalilor metil liberi.

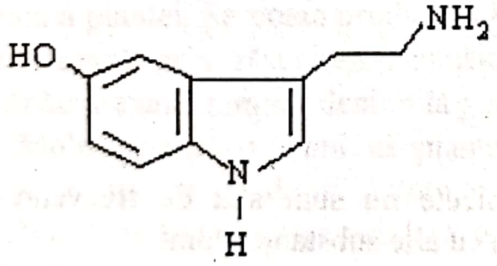
Cea mai evidentă tulburare a SNC este ataxia, vertijul, starea de oboseală, vorbirea neclară, iar în cazurile grave, coma letală.

### *Toxine alcaloidice cu nucleu indolic*

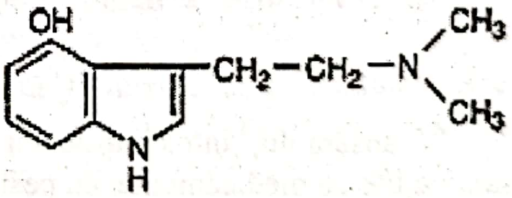
*Psilocybe mexicana* produce *alcaloizi indolici* cu efecte halucinogene puternice – *psilocina şi psilocibina*. Ambele sunt triptamine N-metilate, psilocibina fiind un ester fosforic al psilocinei. Psilocina este de 10 ori mai toxică. După ingestie, psilocibina este convertită repede la psilocină. Cele mai multe ciuperci care produc psilocibina conţin numai cantităţi urmă de psilocină. Psilocina şi psilocibina sunt asemănătoare chimic cu LSD sintetic (dietilamida acidului lisergic). Proprietăţile lor halucinogene sunt asemănătoare cu ale acidului D-lisergic dietilamidei (LSD). Probabil că aceste ciuperci conţin şi alte toxine necunoscute.

Alcaloizii psihoactivi – ergina şi psilocibina – din ciupercile *Psilocybe, Stropharia, Paneolus* şi *Conocybe* au structură indolică (un ciclu azotat), care de asemenea se găseşte în serotonină (un mediator sinaptic natural). Aceşti alcaloizi pot să interfere cu acţiunea serotoninei, producând halucinaţii şi viziuni psihedelice*.

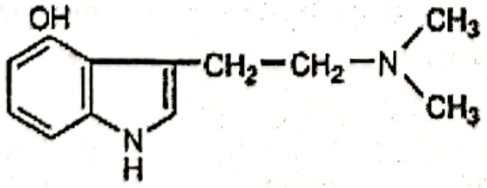
**Psihedelic* (DEX), *psihedelism* defineşte o stare ce se caracterizează prin efecte de lumină, de culoare, sonore etc., care evocă viziuni, halucinaţii, vise, produse prin drogare (din fr. *psychedelique*). Psilocina şi psilocibina au fost folosite în riturile religioase ale aztecilor din Mexic, acum 3500 de ani.



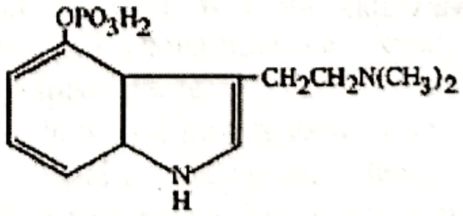

Serotonina (5-hidroxi triptamină)




Ergina




Psilocina

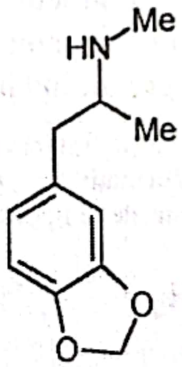



Psilocibina

Persoanele consumă deliberat aceste ciuperci pentru efectele lor halucinogene. *Connocybe, Psilocybe* şi *Stropharia* produc simptome de intoxicaţie evidentă la o oră de la ingestie: stare de confuzie, tremur, euforie, delir, modificarea percepţiei luminii, culorilor. Ingestia nu este fatală. Victimele se tratează cu sedative până la atenuarea efectelor intoxicaţiei.

Amidele acidului lisergic ($LSD_{25}$), psilocibina, mescalina (un halucinogen puternic produs de cactusul *Lophophora williamsii* cu o structură asemănătoare cu aceea a dopaminei, a noradrenalinei şi a amfetaminei) produc starea de euforie. Totuşi, aceşti compuşi nu sunt în primul rând euforizanţi deoarece nu stimulează în principal centrii nervoşi care determină starea de plăcere şi nu garantează consumatorului o stare constantă. Atât mediatorul sinaptic serotonina, cât şi compuşii familiei catecolaminelor* declanşează stările psihedelice datorită în special acţiunii lor ca agonişti parţiali ai receptorilor pentru mediatorii sinaptici din clasa hidroxitriptaminelor în SNC. Receptorii pentru hidroxitriptamine au efect inhibitor asupra neuronilor dopaminergici din corpii striaţi.

* Ecstasy (metilendioximetamfetamina) stimulează eliberarea *serotoninei* şi *dopaminei* la terminaţiile sinaptice. Efectul psihotrop este deosebit de puternic: neîncrederea, suspiciunea, gelozia, invidia dispar şi sunt înlocuite de sentimentul liniştitor al iubirii universale, asociat cu o stare emoţională crescută. Percepţia senzaţiilor rămâne nemodificată. Ecstasy este toxic pentru neuronii serotoninergici.




Ecstasy

În ansamblu, intoxicaţiile cu macromicete nu sunt atât de frecvente ca intoxicaţiile cu medicamente, cu pesticide sau cu alte substanţe chimice.

În intoxicaţiile cu macromicete nu există o metodă de tratament eficientă şi specifică, dar tratamentul simptomatic limitează mult efectele toxinelor şi poate salva viaţa.

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul III*

# TOXINE PRODUSE DE AGENȚII PATOGENI AI PLANTELOR (FITOTOXINE)

*Fitotoxinele* sunt substanțe produse de agenții patogeni ai plantelor care determină leziuni asupra țesutului vegetal și sunt implicate în patogeneză.

Cei mai importanți agenți patogeni ai plantelor, atât în ceea ce privește numărul, cât și din punctul de vedere al pierderilor economice, sunt fungii. Dintre fungii inferiori, *Plasmopara*, *Phytophtora*, *Peronospora* etc., au un potențial distructiv foarte mare, iar fungii care produc tăciunii, mălura, ruginile aparțin bazidiomicetelor.

Fungii patogeni determină procese patologice la toate tipurile de plante, de la cele ierboase, până la cei mai mari copaci. S-au studiat în special agenții patogeni ai plantelor de cultură. Toate părțile aparatului vegetativ sunt sensibile la atacul fungilor. Uneori, fungii distrug țesuturile vegetale imediat după ce contaminează, prin intermediul enzimelor pectinolitice pe care le secretă. În general, o specie fungică are specificitate evidentă pentru anumite parți ale plantei. Leziunile țesuturilor gazdei se datorează producerii toxinelor de către agentul infecțios, blocării vaselor ce transportă apa și nutrienții sau inducerii malformațiilor.

Unele infecții fungice nu distrug țesutul vegetal, dar interferă cu creșterea normală a plantei. Se poate produce o hipertrofiere a unor părți ale plantei, care se exteriorizează prin răsucirea frunzelor sau prin formarea unei mase tisulare asemănătoare unei tumori, denumită *gală*.

Mulți agenți patogeni ai plantelor secretă *fitotoxine* care produc efecte patologice asupra gazdelor. Fitotoxinele sunt factori de virulență ai agenților patogeni, deoarece moartea celulară este un simptom al multor boli ale plantelor. Fitotoxinele sunt produse de agenții patogeni sau sunt rezultatul interacțiunii dintre gazdă și agentul patogen fungic.

Toxinele produse de un agent patogen al plantelor sunt substanțe care determină total sau parțial simptomele maladiei. Se disting două tipuri de toxine:

- toxine a căror acțiune este *selectivă*, adică au specificitate de gazdă. Toxinele cu *acțiune selectivă* produc efecte defavorabile numai asupra varietăților de plante sau genotipurilor care manifestă sensibilitate față de agentul infecțios;
- toxine care au proprietăți *fitotoxice generale* și sunt active față de un număr mare de specii de plante.

Scanned with OKEN Scanner

Fitotoxinele produse de agenţii patogeni ai plantelor lezează ţesuturile şi influenţează evoluţia infecţiei şi apariţia simptomelor. Agenţii patogeni fungici şi bacterieni produc metaboliţi toxici pentru plante, dar pot să nu fie importanţi pentru îmbolnăvirea plantei.

Toxinele pot fi factori de *patogenitate* – proprietate calitativă referitoare la capacitatea agentului patogen de a induce simptomele maladiei sau pot fi factori de *virulenţă*, proprietate cantitativă care exprimă intensitatea simptomelor. Un prim indiciu că patogenitatea unui micoorganism depinde de producerea unei toxine se obţine prin studiul fitotoxinelor produse de un agent patogen cultivat în mediu lichid. Adeseori însă, *in vitro*, fungii sintetizează compuşi diferiţi de cei pe care-i produc *in vivo*, deoarece condiţiile nutritive pot fi foarte diferite. Fitopatologii au elaborat criterii pentru evaluarea rolului toxinelor asupra gazdei:

– izolarea toxinei din planta bolnavă;
– reproducerea simptomelor bolii cu toxina purificată;
– corelarea producerii toxinei cu patogenitatea agentului infecţios;
– producerea toxinei în timpul multiplicării agentului patogen în ţesuturile plantei;
– virulenţa redusă sau absenţa virulenţei la tulpinile atoxigene.

Primele două criterii sunt relativ uşor de reprodus, următoarele două sunt mai greu de verificat, dar nu sunt suficiente pentru a susţine rolul toxinelor în fitopatogeneză. După Yoder, criteriul ultim dintre cele enumerate este singurul convingător.

Structura toxinelor şi mecanismul acţiunii au fost elucidate prin metode chimice şi biochimice.

Toxinele produse de agenţii patogeni ai plantelor determină următoarele efecte:

– inhibă sau suprimă mijloacele de apărare ale gazdei ;
– perturbă echilibrul funcţional al celulelor vegetale, care pot elibera substanţele nutritive ce devin accesibile agentului patogen;
– previn infecţiile secundare cu alţi agenţi patogeni.

Mai jos sunt redate principalele toxine cu efecte patogene asupra ţesuturilor vegetale, agentul patogen producător şi gazda:

| *Toxine cu specificitate de gazdă* | *Patogenul producător* | *Gazda* |
|---|---|---|
| Victorina (Toxina HV) | *Helminthosporium (Cochliobolus) victoriae* | Ovăz |
| Toxinele T, HmT | *H. maydis (C. heterostrophus)* | Porumb |
| Toxina HC | *H.(C.) carbonum* | Porumb |
| Toxina PM | *Phylosticta maydis* | Porumb |
| Toxina HS | *H.(C.) sacchari* | Trestia de zahăr |
| Toxina PC | *Periconia circinata* | Sorg |
| Toxina Ptr | *Pyrenophora tritici repentis* | Grâu |
| Toxinele AK, AAL, ACR, ACT, ACTG, AG, AM, Destruxina B | Diferite patovarietăţi de *Alternaria* | Diferite |

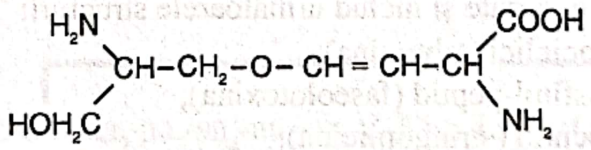
Scanned with OKEN Scanner

| *Toxine fără specificitate de gazdă* | *Patogenul producător* | *Gazda* |
|---|---|---|
| Fusicocina | *Fusicoccum amygdali* | Migdalul |
| Cercosporina | *Cercospora* spp. | Diferite |
| Tentoxina | *Alternaria* spp. | Diferite |
| Tabtoxina | *Ps. syringae* pv. *tabaci* | Tutun |
| | *Ps.* pv. *coronafaciens* | Cereale |
| Phaseolotoxina | *Ps.* pv *phaseolica* | Fasole |
| Siringomicina | *Ps.* pv. *syringae* | Diferite |
| Coronatina | *Ps.* pv. *glycinea* şi altele | Soia |

### *Toxine cu acţiune selectivă produse de bacterii fitopatogene*

Bacteriile fitopatogene produc un spectru larg de compuşi fitotoxici. Toate fitotoxinele bacteriene au acţiune *neselectivă (nespecifică)*, adică sunt active asupra unui spectru mai larg de organisme decât cele pe care le infectează organismul producător. Unele toxine neselective – ca de exemplu, trichotecenele, coronatina, faseolotoxina, siringomicina şi tabtoxina, sunt factori de virulenţă sau contribuie la dezvoltarea simptomelor infecţiei, dar nu sunt determinanţi primari ai spectrului de gazdă.

*Rhizobiotoxina* este sintetizată de *Bradyrhizobium japonicum*, o bacterie simbiontă care produce nodozităţi ale rădăcinii plantelor de soia (*Glycine max*). Unele tulpini sunt patogene, deoarece produc *acidul aminat* toxic - *rhizobiotoxina*. Agentul patogen produce cloroza şi senescenţa prematură a plantei. Toxina inhibă o enzimă a căii de sinteză a etilenei, unul dintre fitohormonii cu rol reglator al creşterii.




Rhizobiotoxina

Speciile fitopatogene ale genului *Pseudomonas* produc o varietate largă de compuşi cu efecte toxice pentru ţesuturile gazdelor. Cele mai bine caracterizate sunt fitotoxinele produse de *Pseudomonas syringae*.

*Pseudomonas syringae* induce o varietate de simptome la plante: moartea rapidă a ţesutului, pătarea frunzelor şi formarea galelor. Specia este împărţită în variante (patovarietăţi), în funcţie de spectrul de gazdă.

Interacţiunea *Pseudomonas syringae* cu ţesuturile plantelor evoluează pe două căi posibile:

– o interacţiune compatibilă, susceptilă, caracterizată de un simptom denumit „saturarea cu apă", urmat de proliferarea patogenului şi progresia simptomelor;
– celulele rezistente răspund prin *reacţia de hipersensibilitate* şi se necrozează în 12–24 ore după inoculare.

Scanned with OKEN Scanner

Genele codificatoare ale răspunsului de tip hipersensibil – *hrp* – (*h*ypersensitive *r*esponse and *p*athogenicity) sunt conservate la toate procariotele fitopatogene şi influenţează capacitatea bacteriei de a induce un răspuns hipersensibil la plantele care nu sunt gazde, patogenitatea la plantele sensibile (gazde) şi capacitatea de a creşte în interiorul sau pe suprafaţa plantei.

Genele *hrp* codifică biosinteza componentelor căii de secreţie de tip III, asemănătoare atât la bacteriile patogene pentru animale (*Salmonella, Shigella* şi *Yersinia*) cât şi la cele patogene pentru plante, funcţională pentru secreţia factorilor de virulenţă.

Genele *hrp* ale pseudomonadelor fitopatogene codifică produse care cresc semnificativ virulenţa patogenului: polizaharide extracelulare, fitotoxine, enzime care degradează peretele celulozic vegetal şi fitohormoni.

Majoritatea toxinelor produse de *Pseudomonas syringae* nu au specificitate de gazdă. Toxinele produc efecte asupra multor plante care nu pot fi infectate de agentul patogen producător al toxinei.

Fitotoxinele produse de *Pseudomonas syringae* induc *cloroza* (coronatina, faseolotoxina, tabtoxina) sau *necroza* (siringomicina şi siringopeptina). Unele fitotoxine pot acţiona prin modificarea proceselor metabolice ale gazdei şi efectele se manifestă numai la nivel biochimic.

Fitotoxinele nu sunt necesare pentru patogenitatea *Pseudomonas syringae*, dar funcţionează ca factori de virulenţă pentru acest patogen şi sinteza toxinelor duce la creşterea severităţii bolii: pot să crească semnificativ virulenţa patogenilor, chiar dacă unele boli apar în absenţa lor.

*Biosinteza* fitotoxinelor este catalizată de sisteme enzimatice neribosomale. Ele au origini chimice variate şi includ următoarele structuri:

- β-lactami monociclici (tabtoxina);
- sulfodiaminofosfinil-peptid (faseolotoxina);
- lipodepsinonapeptid (siringomicina);
- poliketide (coronatina).

Cunoaşterea structurii este foarte importantă, deoarece oferă informaţii despre mecanismul biosintezei. Unele fitotoxine produse de *Pseudomonas syringae* au analogii structurale cu antibioticele, care sunt produse pe calea mecanismelor neribosomale la *Streptomyces* şi *Bacillus*. Aceste căi au servit ca modele pentru înţelegerea sintezei fitotoxinelor.

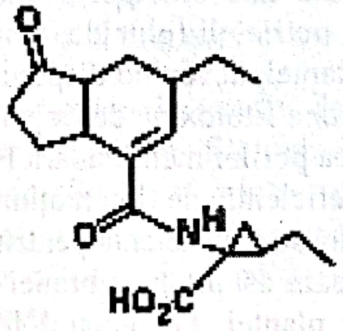
Biosinteza *neribosomală* este catalizată, în general, de proteine multifuncţionale sau de complexe polipeptidice, iar intermediarii sunt transferaţi între domeniile enzimatice şi nu sunt eliberaţi în citoplasmă.

Peptidele neribosomale sunt sintetizate prin mecanismul matriţei cu sulf (thiotemplate), reacţiile fiind catalizate de enzime mari (100–1600 kDa) formate din subunităţi multiple. Toate sistemele multienzimatice care funcţionează cu matriţă cu sulf sunt formate din domenii activatoare ale aminoacizilor, activare ce constă în *adenilarea aminoacizilor* şi formarea tioesterilor.

Scanned with OKEN Scanner

*Poliketidele* formează o familie mare de produse naturale cu structură diferită, care include antibiotice şi substanţe cu acţiune antiparazitară. *Pseudomonas* produce *coronatina*, mupirocina (acid pseudomonic) şi alţi compuşi, pe calea poliketidelor, care este legată de biosinteza acizilor graşi: calea începe cu condensarea acetil-CoA (unitatea de start) şi malonil-CoA (unitatea de extindere a lanţului) şi progresează cu un ciclu de modificări ale grupului carbonil din malonil-CoA (reducerea la hidroxil, deshidratarea cu producerea unei legături duble şi reducerea pentru a forma un acid gras saturat).

*Coronatina* produce o clorozǎ difuză la o varietate de specii de plante. La *Arabidopsis thaliana*, coronatina injectată induce acumularea pigmenţilor antocianici la situsul inoculării şi o culoare închisă. De asemenea, induce hipertrofia tisulară la locul inoculării, inhibiţia creşterii rădăcinii şi stimulează producerea etilenei.




Coronatina

*Siringomicina* este reprezentantul clasei lipodepsinonapeptidelor (fig. 37), alcătuite dintr-un capăt peptidic polar şi o coadă de acid gras hidrofob 3-hidroxi.

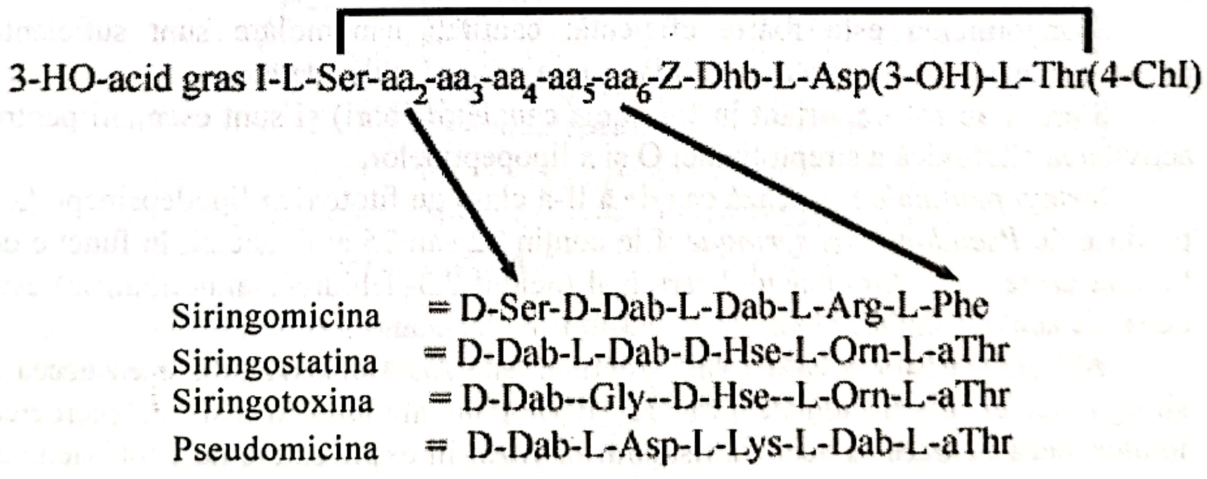



Fig. 37 – Structura lipodepsinonapeptidelor (siringomicina, siringostatina, siringotoxina, pseudomicina), care diferă prin natura aminoacizilor din poziţiile 2-6. Gruparea de acid gras 3-hidroxilat provine din acidul decanoic (siringomicina), acidul dodecanoic (siringomicina şi siringostatina), acidul tetradecanoic (toate cele 4 lipodepsinonapeptide şi acidul hexadecanoic (pseudomicina). Prescurtările aminoacizilor nonstandard: Asp (3-OH) = acid 3-hidroxiaspartic; Dab = acid 2,4 diaminobutiric; Dhb = acid 2,3 dehidroaminobutiric; Hse = homoserina; Thr (4-Chl) = clorotreonina; *a*Thr = *allo*treonina.

Scanned with OKEN Scanner

Toxina induce necroza ţesuturilor plantei. Ţinta primară a acţiunii sale este membrana celulei. Structura lipopeptidică amfipatică a siringomicinei favorizează inserţia sa în dublul strat lipidic al membranei, formând pori liber permeabili pentru cationi. După inserţia în stratul dublu lipidic, monomerii de siringomicină se agregă în complexele porului, format din cel puţin 6 molecule de siringomicină. Regiunea lipofilă a toxinei este orientată spre dublul strat lipidic, iar peptidul hidrofob rămâne la suprafaţa membranei. Canalele individuale se pot agrega şi funcţionează sincron (se deschid şi se închid concomitent).

Toxina induce creşterea fluxului transmembranar al ionilor de $K^+$, $H^+$ şi $Ca^{2+}$, cu efecte citocide. Influxul $H^+$ şi al $Ca^{2+}$ este însoţit de efluxul $K^+$. Schimbul celor două tipuri de ioni generează un gradient electrochimic care modifică pH, producând acidifierea citoplasmei. Influxul ionilor de $Ca^{2+}$ activează o cascadă de evenimente, a căror finalitate este încorporarea 1,3-β-calozei în peretele celular. Odată cu formarea porilor, nutrienţii (glucide, aminoacizi) sunt eliberaţi în spaţiul extracelular al ţesuturilor plantei, devenind disponibili celulei bacteriene.

Siringomicina este prima fitotoxină descoperită, cu rol de factor de virulenţă, care acţionează prin formarea porilor membranari. Formarea porilor transmembranari este o modalitate foarte eficientă de interacţiune a toxinei, deoarece cantităţi nanomolare de siringomicină sunt suficiente pentru inducerea efectelor citopatice.

Siringomicina acţionează asupra membranei citoplasmatice a celulei gazdă şi induce necroza ţesuturilor plantei. Fenomenul formării porilor transmembranari este frecvent întâlnit la citotoxinele active asupra celulei animale (de exemplu, streptolizina O), rezultatul fiind citoliza datorită influxului masiv al ionilor.

Sterolii, în special ergosterolul, favorizează legarea siringomicinei de celule, dar toxina a format pori şi în membranele artificiale dublu stratificate, în absenţa sterolilor.

Siringomicina este foarte eficientă: cantităţi nanomolare sunt suficiente pentru a induce o activitate detectabilă asupra protoplaştilor de tutun.

Sterolii au rol important în formarea canalelor (pori) şi sunt esenţiali pentru activitatea citotoxică a streptolizinei O şi a lipopeptidelor.

*Siringopeptinele* formează cea de a II-a clasă de fitotoxine lipodepsipeptidice produse de *Pseudomonas syringae*. Ele conţin 22 sau 25 aminoacizi, în funcţie de tulpina bacteriană. Aminoacidul terminal (acidul 2,3-dehidro-2-aminobutiric) este acilat de acidul 3-hidroxidecanoic sau 3-hidroxidodecanoic.

Activitatea fitotoxică a siringopeptinei este foarte asemănătoare cu aceea a siringomicinei: toxina induce formarea porilor membranari, urmată de pierderea ionilor, ceea ce duce la necroză tisulară. *In vitro,* în experienţele de citotoxicitate, siringopeptina este mai activă în comparaţie cu siringomicina, deoarece porii membranari au dimensiuni mai mari decât cei formaţi de siringomicină. Liza protoplaştilor mezofilului de tutun şi a hematiilor survine rapid.

Siringopeptina, ca şi siringomicina, are activitate antimicrobiană faţă de anumite bacterii Gram pozitive şi fungi, dar spectrul lor de activitate este diferit.

Scanned with OKEN Scanner

De exemplu, unele tulpini de *Botrytis cinerea* sunt foarte sensibile la siringopeptină, dar sunt rezistente la siringomicină. *Geotrichum candidum* se comportă invers față de cele două fitotoxine. Activitatea antimicrobiană a celor două clase de lipodepsipeptide nu este cunoscută, dar contrastează cu mecanismul comun al acțiunii lor: formarea porilor în protoplaștii de tutun, eritrocite și în membranele artificiale.

Cele două lipodepsipeptide sunt secretate printr-un mecanism comun: un transportor al familiei ABC, care are rolul în secreția proteinelor citotoxice și proteolitice ale procariotelor. Transportorii acestei familii sunt implicați în exportul antibioticelor peptidice sintetizate prin mecanisme ribosomale și neribosomale.

Toate tulpinile patogene de *Pseudomonas syringae* produc ambele clase de fitotoxine lipodepsipeptidice, ceea ce sugerează rolul lor în interacțiunea bacteriei cu planta. Siringomicina și siringopeptina sunt citotoxine formatoare de pori membranari și produc necroza țesutului prin același mecanism.

*Tabtoxina* este un β-lactam monociclic produs de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci, coronafaciens* și *garcae*. Este o fitotoxină dipeptidică alcătuită din *tabtoxinin-β-lactam* (TβL) *monociclic*, legat printr-o punte peptidică de *treonină* (fig. 38). Deși TβL este metabolitul intracelular primar, cloroza se produce după hidroliza legăturii peptidice de către aminopeptidazele de origine vegetală sau bacteriană. Componenta toxică este TβL.

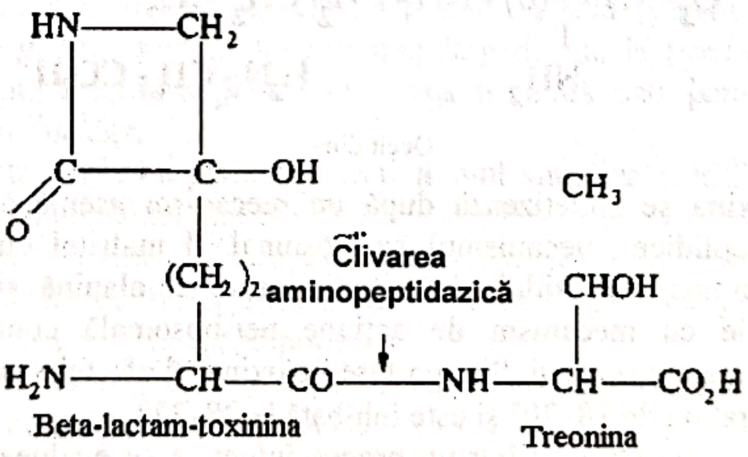


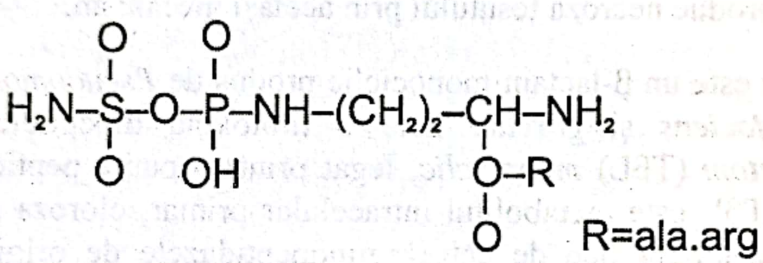

Fig. 38 – Structura chimică a *tabtoxinei* de la *Pseudomonas syringae*. Molecula dipeptidică este alcătuită din tabtoxinin-β-lactam legată printr-o punte peptidică de treonină. Săgeata indică situsul acțiunii aminopeptidazei, care eliberează componenta activă, tabtoxinin-β-lactam (după Bender și colab., 1999).

TβL inhibă ireversibil *glutamin-sintetaza*, care produce două efecte principale: enzima catalizează calea majoră a sintezei glutaminei la plante și este singura cale de detoxificare eficientă a amoniului. Amoniul are efecte defavorabile asupra celulei vegetale: ruperea membranei tilacoidale a cloroplastelor și necuplarea fotofosforilării.

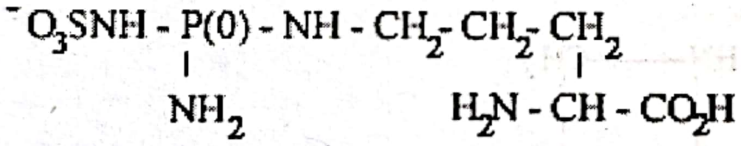
Scanned with OKEN Scanner

Bacteria este protejată de acţiunea toxinei pe care o produce prin mecanismul *adenilării glutamin-sintetazei*, care face ca enzima să fie mai puţin sensibilă la inactivarea de către TβL. Alt mecanism posibil de detoxificare implică producerea unei β-lactamaze, care hidrolizează inelul β-lactamic al TβL şi astfel eliberează metabolitul netoxic, tabtoxinina.

*Faseolotoxina* este sintetizată de patovarietăţile de *Pseudomonas syringae* care produc pătarea leguminoaselor. Este un *sulfodiaminofosfinil* legat de un *tripeptid* ce constă din *ornitină, alanină* şi *homoarginină*. Toxina este activată în ţesuturile plantei de o peptidază, care astfel eliberează un derivat al ornitinei – *octicidina* – forma predominantă a toxinei în ţesuturile infectate. Octicidina este inhibitorul competitiv ireversibil al *ornitin-carbamoil-transferazei* (OCT-aza), o enzimă esenţială în ciclul ureii, care converteşte ornitina şi carbamoil-fosfatul la citrulină şi produce acumularea ornitinei şi deficitul celular de arginină, ducând la cloroză.




Faseolotoxina



Occitidina

Faseolotoxina se sintetizează după un mecanism asemănător cu acela al antibioticelor peptidice: mecanismul neribosomal al matriţei cu sulf, deoarece molecula sa conţine tripeptidul alcătuit din ornitină, alanină şi homoarginină. Peptid-sintetazele cu mecanism de acţiune neribosomală conţin domenii de adenilare şi de legare a sulfului. Sinteza faseolotoxinei şi efectul său – cloroza – este indusă la temperatura de 18–20° şi este inhibată la 28–32°.

Producerea fitotoxinelor într-un proces infecţios se evaluează prin efectele vizibile asupra plantei: piticire, cloroză, necroză şi ofilire. Uneori însă, fitotoxinele acţionează prin modificarea proceselor metabolice şi astfel efectele defavorabile se pot evidenţia numai la nivel biochimic. Dacă un metabolit toxic al agentului patogen este suspectat că determină efecte patologice, este necesară extracţia componentului din organismul producător. Producerea toxinei *in vitro* simplifică foarte mult procedeul de purificare din faza apoasă sau a unui solvent organic. Reproducerea experimentală a leziunilor tisulare (cloroză, necroză) după injectarea toxinei în ţesutul foliar al plantei este dovada esenţială a rolului fitotoxinelor în simptomatologia şi dezvoltarea bolii.

Scanned with OKEN Scanner

Producerea fitotoxinelor poate fi detectată indirect prin efectele lor inhibitorii asupra creşterii bacteriilor sau fungilor.

### *Toxine cu acțiune selectivă produse de fungi fitopatogeni*

*Inițierea procesului infecțios* este cunoscută la *Alternaria.* Speciile genului *Alternaria* sunt patogeni foliari, care distrug lent țesutul gazdei prin reducerea potențialului fotosintetizant. Infecția duce la formarea *leziunilor necrotice* cu aspect particular, ceea ce reflectă întreruperea creşterii agentului infecțios, cauzată de condiții nefavorabile. Miceliul fungic este localizat în centrul leziunii, înconjurat fiind de un halou clorotic neinvadat, datorat difuziei metaboliților fungici şi a toxinelor. Acesta este un simptom comun al fungilor patogeni necrotrofi.

Speciile genului *Alternaria* produc frecvent infecții criptice, în care miceliul intră în țesutul plantei, unde rămâne în stare latentă până când condițiile devin favorizante creşterii. Infecția cu *Alternaria* nu influențează transportul apei sau al nutrienților pentru că nu infectează rădăcinile şi nici vasele. Plantele devitalizate datorită stresului, senescenței sau rănirii mecanice sunt mai sensibile la infecție. Speciile saprobinte, aşa cum este *Alternaria*, pot deveni parazite dacă întâlnesc o gazdă cu rezistență diminuată. Această observație ilustrează faptul că distincția dintre saprobionte şi parazite nu este totdeauna bine delimitată.

Pentru colonizarea țesutului gazdei, unii fungi patogeni produc metaboliți secundari fitotoxici care lezează selectiv plantele gazdă (aşa numitele *toxine cu selectivitate de gazdă*) sau un spectru mai larg de gazde (*toxinele neselective*). Toxinele nu sunt necesare pentru creşterea normală sau pentru reproducerea organismului producător.

Toate fitotoxinele cu acțiune selectivă sunt sintetizate de fungi paraziți. Se disting două tipuri de parazitism fungic:

- parazitismul *necrotrof*: infecția determină distrugerea țesutului şi moartea plantei. Astfel de fungi sunt paraziți facultativi, adică pot să crească pe materialul vegetal în descompunere;
- parazitismul *biotrof*: parazitul şi gazda conviețuiesc perioade mai lungi. Parazitul preia nutrienții şi substanțele reglatoare de creştere din țesuturile plantei, dar nu provoacă moartea ei. Cei mai mulți fungi biotrofi sunt obligat paraziți: supraviețuiesc ca saprobionți o perioadă limitată, iar dezvoltarea corpului de fructificare este dependentă de prezența gazdei. Cultivarea acestor fungi în mediu inert a reuşit în puține cazuri.

Speciile patogene ale genului *Alternaria* produc toxine cu acțiune *nespecifică* sau *specifică.*

*Toxinele fungice cu selectivitate (specificitate) de gazdă* sunt metaboliți secundari cu gr. mol. mică, cu structură diversă, ce acționează ca agenți de virulență ai agenților patogeni. S-au identificat circa 20 de toxine cu *specificitate de gazdă* (toxine *HST* = *h*ost *s*elective *t*oxins). Aceste toxine determină *specificitatea* de gazdă

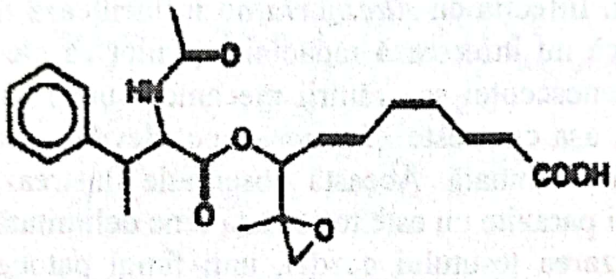
Scanned with OKEN Scanner

a agentului patogen producător, adică speciile de plante, varietăţile sau genotipurile sensibile la o astfel de toxină, sunt sensibile şi la agentul producător.

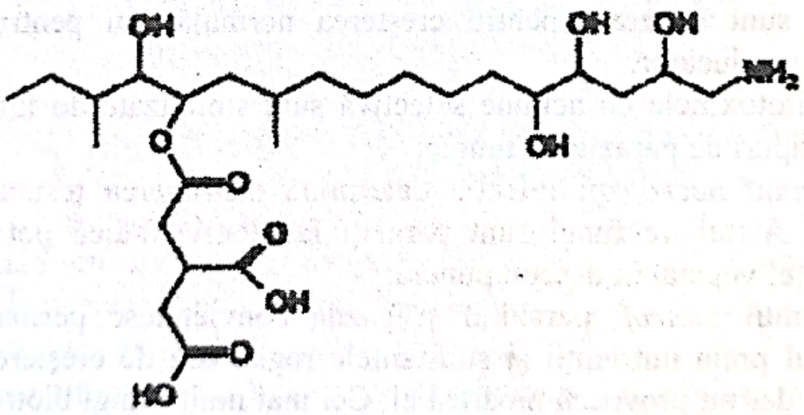
La fungi, *toxinele cu specificitate* de gazdă sunt produse în special, de speciile a două genuri: *Alternaria* şi *Cochliobolus*.

Toxinele cu specificitate de gazdă sunt produse de cel puţin 12 specii de *Alternaria*. Multe tulpini producătoare sunt patovariante ale speciei *Alternaria alternata*. Toate patovarietăţile de *Alternaria* au cromosomi mici, supranumerari. Aceşti cromosomi nu sunt esenţiali pentru creşterea normală, dar codifică anumite molecule care conferă un avantaj în anumite condiţii de mediu.

Clasele chimice ale toxinelor cu specificitate de gazdă sunt: poliketide, peptide ciclice, compuşi terpenici, glucide, polipeptide sintetizate pe ribosomi şi compuşi cu biogeneză necunoscută. Unele toxine cu acţiune specifică de gazdă sunt înrudite cu alţi compuşi toxici: de exemplu, toxina AAL (*Alternaria alternata*) se aseamănă cu fumonisina produsă de *Fusarium moniliforme*.



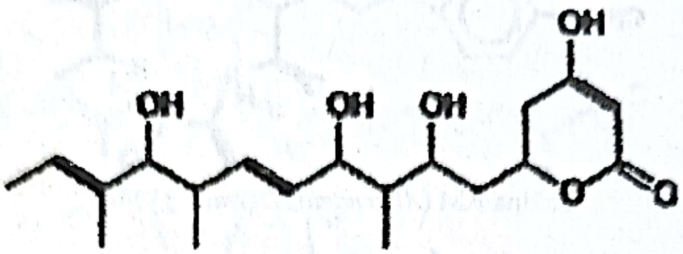

Toxina AK (*Alternaria alternata* pv. păr japonez)



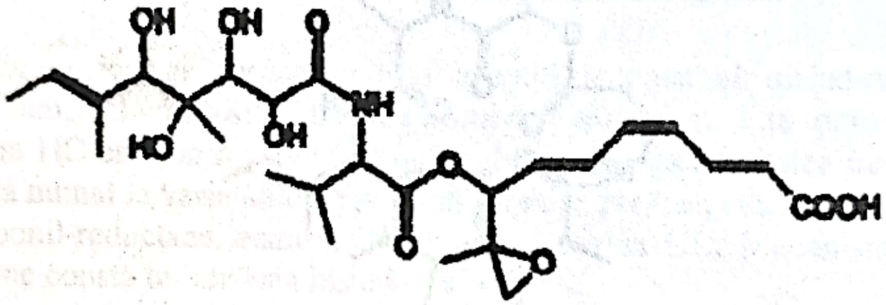

*Toxina AAL* (*Alternaria alternata* pv. lycopersici)

Toxina AAL este un aminopentol-ester, un analog al sfinganinei, precursorul sfingozinei (o ceramidă). Toxina se aseamănă cu fumonisina $B_1$ produsă de *Fusarium moniliforme*. Fumonisina $B_1$ are toxicitate selectivă pentru genotipurile de tomate sensibile la AAL. Ca şi fumonisina $B_1$, toxina AAL este inhibitorie a biosintezei sfingozinei. Aplicarea AAL pe frunze duce la acumularea precursorilor sfingozinei, scăderea sfingolipidelor complexe şi moartea speciilor sensibile de tomate. Efecte similare se produc şi asupra celulelor mamiferelor. În celulele

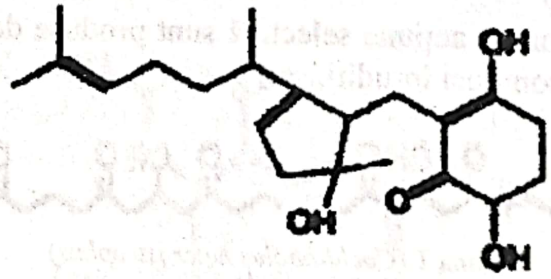
eucariote, ceramidele modulează răspunsul celular la acțiunea factorilor de stres: opresc ciclul celular și inițiază apoptoza. Moartea celulei vegetale indusă de AAL are caracteristici comune cu apoptoza celulei animale.



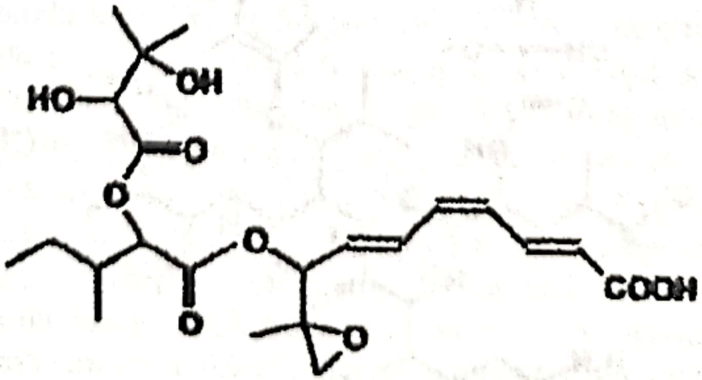

Toxina ACR (*Alternaria alternata* pv. lămâi)



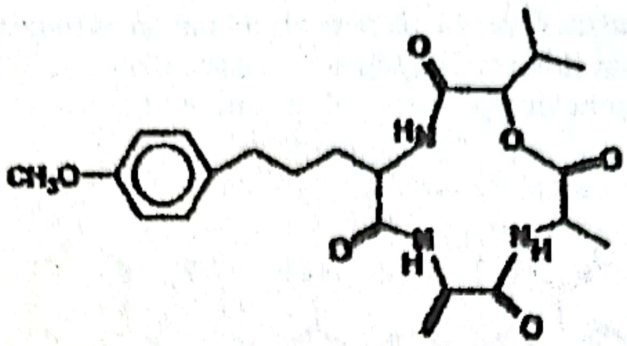

Toxina ACT (*Alternaria alternata* pv. tangerine)



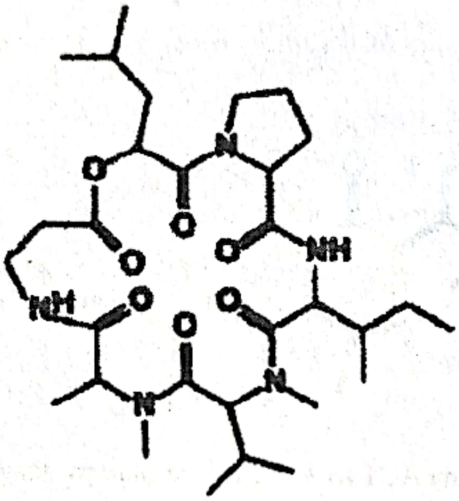

Toxina ACTG (*Alternaria alternata* pv. tangerine)




Toxina AF (*Alternaria alternata* pv. căpșun)

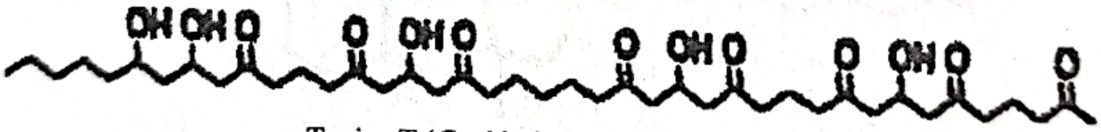


Toxina AM (*Alternaria alternata* pv. măr)

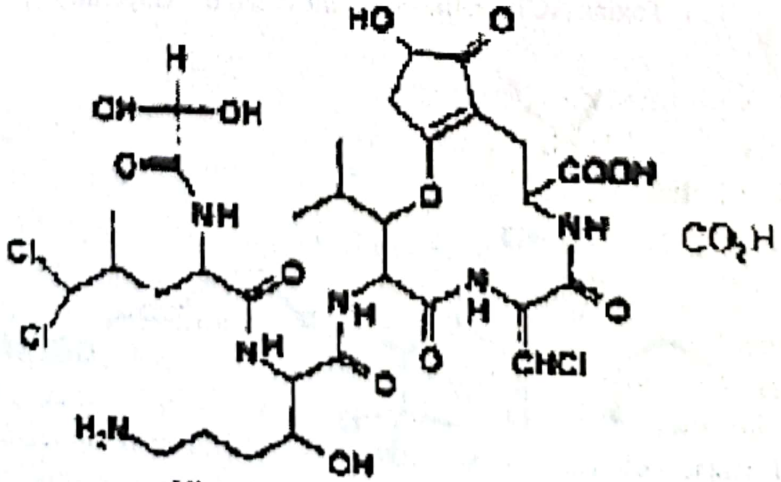


Destruxina B (*Alternaria brasicae*)

Toate aceste toxine cu acţiune selectivă sunt produse de *Alternaria alternata* şi formează familii de compuşi înrudiţi.



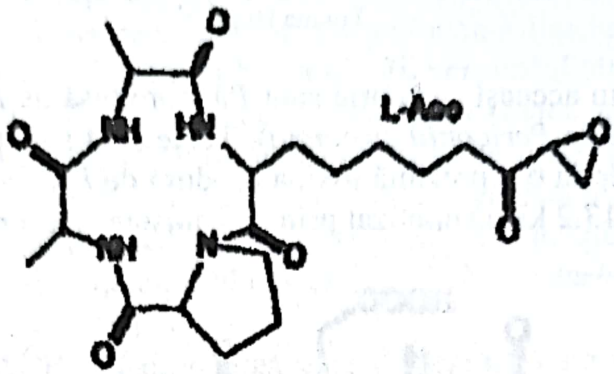
Toxina T (*Cochliobolus heterostrophus*)



Victorina (*Cochliobolus victoriae*)

Scanned with OKEN Scanner

*Victorina* este produsă de *Cochliobolus (Helminthosporium) victoriae*, agentul patogen al maladiei frunzelor striate ale ovăzului (*Avena sativa*).

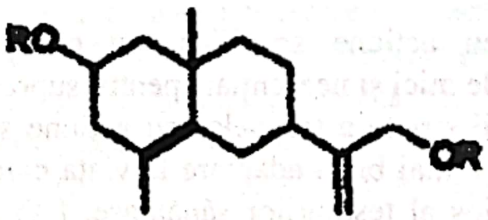


*Toxina HC* (*Cochliobolus = Helminthosporium carbonum*)

*Helminthosporium carbonum* este agentul patogen al maladiei frunzelor striate la porumb (helmintosporioza). Factorul de patogenitate este toxina HC.

Toxina HC este un *tripeptid ciclic* ce determină specificitatea maladiei care se manifestă numai la varietățile de porumb recesive pentru gena Hm, codificatoare a unei carbonil-reductaze, enzimă ce detoxifică toxina HC. Mecanismul acțiunii acestei toxine constă în inhibiția histon-deacetilazei.

Totdeauna patogenitatea acestor două specii (*Helminthosporium carbonum* și *Helminthosporium victoriae*) este dependentă de sinteza celor două toxine.

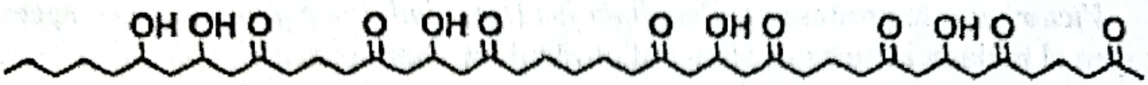


*Toxina HS (Helminthosporium sacchari).*
R = β-galactofuranozil-β-galactofuranozid.

Toxina HS produsă de *Helminthosporium sacchari* induce maladia frunzelor striate la trestia de zahăr. Structural, toxina este un derivat sesquiterpenoidic, format din subunități galactofuranozidice. Se pare că efectele sale sunt limitate la varietățile sensibile de trestie de zahăr, care posedă un receptor specific pentru această toxină. Mecanismul acțiunii constă în activarea unei ATP-aze membranare.

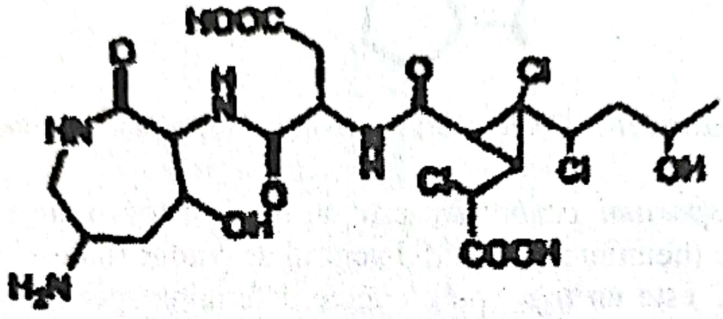
Toxina *HmT* produsă de *Helminthosporium maydis* a fost izolată inițial sub forma unui glicozid steroidic, iar ulterior sub forma unei poliketide lineare cu 40 atomi de C. Toxina inhibă fosforilarea oxidativă în mitocondriile varietăților sensibile de porumb, de tip TMS (Texas male sterility), un sistem de sterilitate masculină, utilizat pentru producerea hibrizilor de porumb.

Scanned with OKEN Scanner

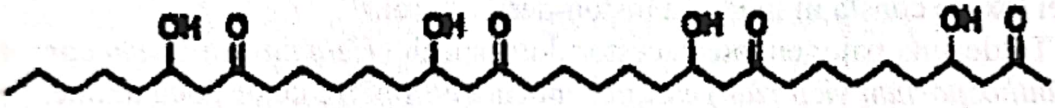


Toxina HmT

Alte toxine din aceeaşi categorie sunt *PM* (produsă de *Phylosticta maydis*) şi *peritoxina* (produsă de *Periconia circinata*). Toate sunt sintetizate prin mecanisme neribosomale. Excepţia o reprezintă toxina produsă de *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*), un peptid de 13,2 kDa sintetizat prin mecanisme ribosomale.



Peritoxina (*Periconia circinata*)



Toxina PM (*Phylosticta maydis* sau *Mycosphaerella zeae-maydis*)

Toate toxinele cu acţiune specifică, cu excepţia Ptr, sunt *metaboliţi secundari*. Sunt molecule mici şi neesenţiale pentru supravieţuire şi reproducere.

Explicaţia limitării stricte a toxinelor cu acţiune specifică, la speciile celor două genuri ar putea fi o mai bună adaptare la viaţa parazitară, care le permite să iniţieze procesul infecţios al ţesuturilor sănătoase, faţă de ceilalţi fungi patogeni care infectează ţesuturile lezate sau devitalizate. Altă explicaţie ar fi că speciile celor două genuri (*Alternaria* şi *Cochliobolus*) sintetizează toxinele *in vitro*, ceea ce a uşurat studiul lor. Probabil că alţi fungi sintetizează toxine cu selectivitate de gazdă numai *in vivo*.

Metaboliţii secundari au în primul rând funcţii ecologice, de modulare a interacţiunii organismului cu mediul şi cu alte organisme, ca de exemplu, apărarea antiinfecţioasă a plantei şi interacţiunile dintre plante şi microorganismele simbionte.

### *Mecanismul de acţiune al fitotoxinelor cu specificitate de gazdă*

Situsul de acţiune al diferitelor toxine variază, dar rezultatul final este acelaşi şi constă în moartea necrotică a celulei. Toxinele AF, ACT, ACTG acţionează

asupra membranei plasmatice şi produc modificarea permeabilității. Toxina AM acționează nu numai asupra membranei plasmatice, dar şi asupra cloroplastelor, iar ACT şi AT sunt active față de membrana mitocondriilor. Toxina ACR produce umflarea şi alte modificări morfologice ale mitocondriilor, creşte rata oxidării NADH, pierderea electroliților datorită modificării permeabilității şi necroza.

Pentru *destruxina B* produsă de *Alternaria brassicae*, mecanismul acțiunii selective se datorează detoxificării rapide şi eficiente prin *reacții de hidroxilare şi glicozilare* în țesuturile plantei rezistente. Aceleaşi reacții se desfăşoară în țesuturile plantelor susceptibile, dar la o rată inferioară. Acelaşi mecanism al detoxificării explică rezistența unor plante la *Cochliobolus carbonum*, care produce toxine cu specificitate de gazdă.

Pentru toxina ACR, specificitatea este determinată de prelucrarea diferită post-transcriere a unei gene mitocondriale. Gena se găseşte în ADN mitocondrial al speciilor de plante rezistente şi sensibile. La speciile de plante rezistente, gena este transcrisă într-o copie mai scurtă. În mitocondriile plantelor sensibile se sintetizează o proteină oligomeră, iar în mitocondriile plantelor rezistente, proteina nu se sintetizează.

Toxinele au efecte citocide (omoară celulele), fiind active la concentrații cuprinse între 10 pM – 1 μM şi produc boli distructive. În absența lor, manifestările patologice nu se produc.

Cel mai comun test pentru toxinele cu acțiune specifică şi nespecifică este stimularea pierderii electrolitului, inhibiția creşterii rădăcinii, cloroza şi necroza după injectarea în mezofilul frunzei. Pierderea electrolitului reflectă incapacitatea celulelor muribunde de a menține integritatea structurală şi funcțională a membranei. Toxinele cu acțiune specifică produc pierderea nutrienților cu moleculă mică (aminoacizi, glucide), care difuzează din celula vegetală în spațiul extracelular (apoplast), unde pot fi absorbiți de miceliul fungic.

Mulți fungi producători ai toxinelor cu acțiune specifică sunt *patogeni ai frunzelor*. Toxinele cu greutate moleculară mică difuzează uşor, ceea ce a a făcut posibilă furnizarea dovezii că toxina are rol determinant în inducerea apariției simptomelor: de exemplu, cloroza este reprodusă de toxină, la distanță de situsul infecției.

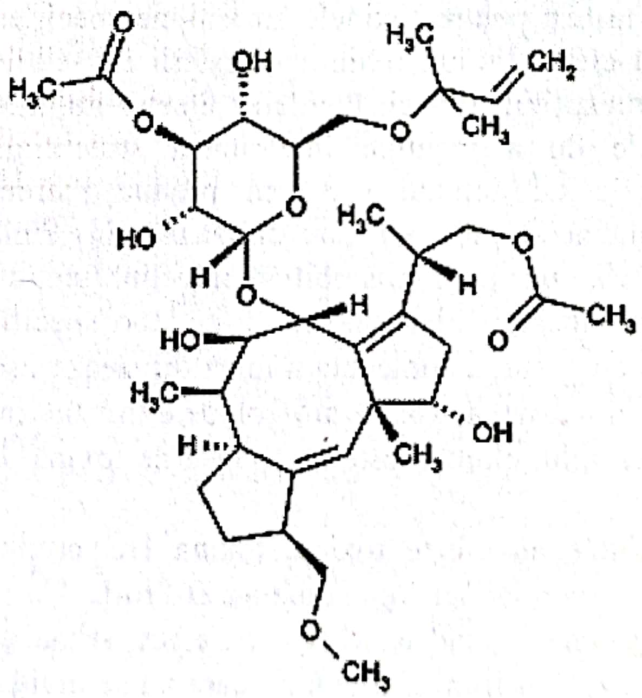
Nu toate toxinele au efecte toxice: toxina HC produsă de *Cochliobolus carbonum* este un tetrapeptid ciclic cu structura D-Pro-L-Ala-D-Ala-L-Aeo (Aeo = 2-*a*mino-9,10-*e*poxi-8-acid *o*xadecanoic), cu efect stimulator asupra creşterii protoplaştilor din mezofilul frunzei de tutun, care nu se divid. Situsul acțiunii sale este *histon-deacetilaza*. Enzima deacetilează reversibil histonele $H_3$ şi $H_4$ în timp ce acestea sunt asamblate în cromatină şi astfel poate influența expresia genelor pe calea efectelor asupra structurii cromatinei. Inhibiția histon-deacetilazei, ca model de acțiune a unui factor de virulență, poate să interfere cu expresia genelor de apărare, permițând progresia invaziei fungice.

Scanned with OKEN Scanner

***Toxine cu acţiune nespecifică (neselectivă)***

Majoritatea toxinelor produse de fungii patogeni pentru plante au acţiune neselectivă, adică toxinele au un spectru de acţiune mult mai larg decât agentul producător. Genul *Fusarium* are multe specii parazite pentru plante, efectul patologic fiind ofilirea. Miceliul fungic invadează ţesutul vascular şi conidiile blochează vasele de xilem, împiedicând transportul apei. *Fusarium oxysporum* produce toxine care contribuie la veştejirea plantei prin modificarea permeabilităţii membranei celulare şi perturbarea metabolismului. Toxinele lipsite de specificitate de gazdă au efecte fitotoxice de intensitate medie şi produc leziuni la un spectru larg de gazde având rolul de factori de virulenţă.

*Fusicocina* este o substanţă heterociclică produsă de *Fusicoccum amygdali*, un agent patogen bacterian al migdalului (*Amygdalus communis*). Toxina, o substanţă heterociclică, induce deschiderea stomatelor la plantele pe care le infectează, ceea ce determină ofilirea prin pierderea excesivă a apei. Modul de acţiune constă în *activarea pompei de protoni* din membrana plasmatică, implicată în procese fiziologice fundamentale: menţinerea gradientului protonic al membranei, a pH-ului celular şi eliminarea substanţelor toxice. Dereglarea ATP-azei determină creşterea ratei ieşirii ionilor de K şi Cl şi a apei din celulele stomatelor, cu deshidratarea ireversibilă şi instalarea stresului hidric.




Fusicocina (*Fusicoccum amygdali*)

În multe sisteme *in vitro* (coleoptil de ovăz, epicotil de mazăre, hipocotil de fasole), *fusicocina* acţionează ca o auxină.

Genomul fungilor patogeni pentru plante conţine gene care probabil sunt implicate în sinteza metaboliţilor secundari: ele codifică *sintazele* pentru peptide

neribosomale şi *poliketid-sintazele*, iar fungii saprobionți par a fi deficienți în sinteza acestor enzime.

Plantele pot fi rezistente la un agent patogen dacă produc enzime care pot să catalizeze detoxificarea fitotoxinelor. Genele plantelor care codifică sinteza unor compuşi ce conferă rezistență la agenții patogeni au fost clonate. O genă de rezistență codifică o enzimă ce detoxifică *toxina HC*, o toxină cu acțiune selectivă (cu specificitate de gazdă), produsă de un patogen al porumbului (*Cochliobolus carbonum*). Detoxificarea toxinei HC a rezultat prin reducerea unei grupări carbonil pe catena laterală a unuia dintre aminoacizii constituienți. Alt exemplu este gena pentru detoxifierea *tabtoxinei*, care a fost transferată la plantele transgenice de tutun, primele plante rezistente la focul sălbatic al tutunului, o boală produsă de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Tabtoxina acționează neselectiv. Plantele de tutun modificate genetic, rezistente la procesul infecțios, s-au obținut prin introducerea genei ce codifică acetil-transferaza, enzimă ce catalizează detoxifierea tabtoxinei. Un al treilea exemplu este al plantelor de sfeclă de zahăr care au fost modificate prin transferul unei gene care codifică o enzimă (o esterază) ce detoxifică o fitotoxină neidentificată.

Aceste exemple ilustrează faptul că enzimele care detoxifică fitotoxinele produse de microorganismele patogene formează un mecanism important de protecție anti-infecțioasă.

*Dothistroma pini*, agentul patogen al pinului, produce *dothistromina*, o *fitotoxină* difurano-antraquinonică, asemănătoare structural cu versicolorina B, precursorul aflatoxinei. Dothistromina este produsă şi de speciile de *Cercospora*, inclusiv *Cercospora arahidicola*, agentul patogen al arahidelor.

Treptele sintezei dothistrominei sunt comune cu ale aflatoxinei, produsă de *Aspergillus parasiticus* şi *Aspergillus flavus*.

Dothistrominei i se atribuie un rol important în patogenitatea agentului nectrotrof *Dothistroma pini*, deoarece injectarea toxinei purificate în frunzele de pin a produs leziuni necrotice ca şi infecția naturală cu agentul patogen.

Celulele învecinate celor necrozate de dothistromină produc acid benzoic, cu efecte toxice, rezultatul fiind moartea frunzelor de pin. Defolierea diminuă randamentul masei lemnoase şi produce chiar moartea copacului.

Dothistromina este o toxină puternică, cu spectru larg de acțiune. Fiind o fitotoxină, dothistromina este toxică pentru o varietate de celule microbiene şi animale. Are acțiune uşor mutagenă şi clastogenă*, ceea ce pune problema influenței acestei toxine asupra sănătății lucrătorilor forestieri şi din industria lemnului.

* Efectul clastogenic defineşte capacitatea unei substanțe sau al unui amestec de substanțe de a induce ruperi cromosomale.

Structura chimică a dothistrominei asemănătoare aflatoxinei (fig. 39), are un corespondent genetic: genele codificatoare ale ambelor toxine sunt grupate într-o regiune de 60–70 kbp, deşi ordinea lor diferă.

Scanned with OKEN Scanner

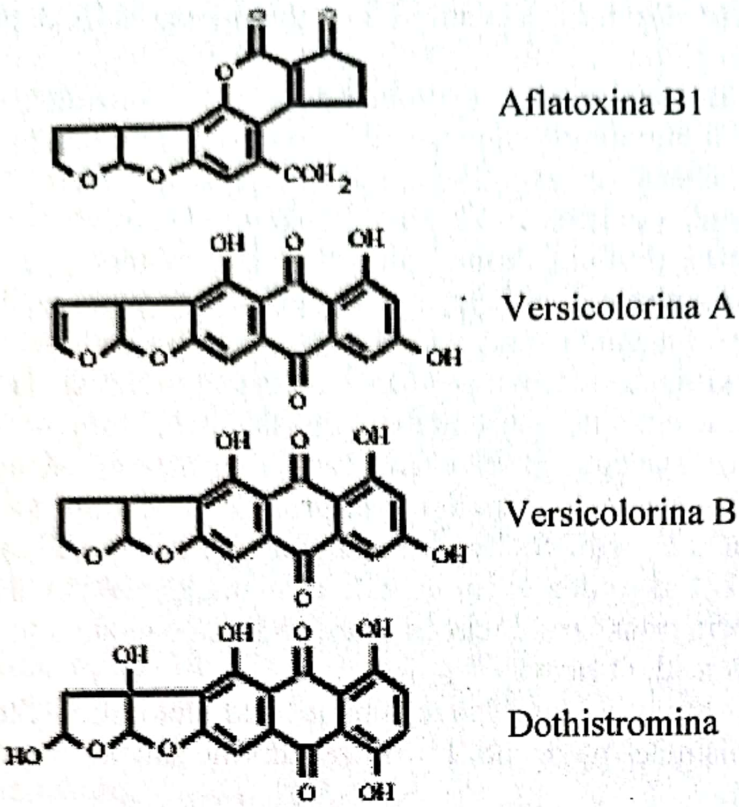
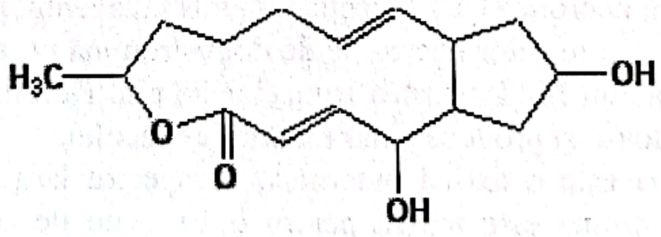



Fig. 39 – Asemănarea structurilor chimice
ale aflatoxinei $B_1$, versicolorinei A, versicolorinei B şi dothistrominei.

Cele mai cunoscute toxine cu acţiune nespecifică produse de speciile de *Alternaria* sunt brefeldina A, curvularina, acidul tenuazonic, tentoxina şi ziniolul. Ele exercită efecte toxice diverse.

*Brefeldina A* produce dezasamblarea complexelor Golgi şi acţionează ca un inhibitor al secreţiei celulare.



Brefeldina A

*Curvularina* inhibă diviziunea celulară perturbând asamblarea microtubulilor.

*Acidul tenuazonic* inhibă sinteza proteinelor, iar *ziniolul* modifică permeabilitatea membranei.

*Tentoxina* produsă de *Alternaria alternata* acţionează ca inhibitor al fotofosforilării prin legarea specifică de ATP-sintaza cloroplastelor, producând inhibiţia hidrolizei şi sintezei ATP. Deoarece influenţează procese celulare fundamentale, toxinele cu acţiune nespecifică sunt adeseori toxine puternice.

Plantele se apără de infecția fungică prin diferite mecanisme: detoxifierea toxinelor, stimularea concomitentă a sintezei fitoalexinelor, producerea intermediarilor reducerii $O_2$.

Fungii anihilează mecanismele de apărare ale plantei gazdă prin diferite mecanisme:

- *Alternaria alternata*, în prezența extractului de plante de tutun, sintetizează *manitolul* care acționează ca inactivator al intermediarilor reactivi ai $O_2$;
- sinteza *melaninelor*. Melaninele sunt pigmenți de culoare închisă cu gr. mol. mare, produse de organismele animale, plante și microorganisme. Se formează prin polimerizarea oxidativă a compușilor fenolici sau indolici. Melaninele sunt formate din inele aromatice, cu grupări OH. Unii fungi produc melanine prin oxidarea dihidroxifenilalaninei (DOPA). Pigmenții melanici au rolul de a proteja sporii fungici de condițiile stresante ale mediului extern: temperaturi extreme, radiații UV.

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul IV*

# TOXINE PRODUSE DE CIANOBACTERII ŞI DE ALGE

În ape se găseşte o multitudine de organisme cu acţiune patogenă directă sau indirectă: protozoare, viermi helminţi, fungi, alge, cianobacterii, bacterii.

*Cianobacteriile* formează un grup de organisme procariote, cu particularităţi unice structurale şi funcţionale, larg răspândite în mediile naturale şi care produc adeseori „înfloriri" ale apelor eutrofe dulci şi salmastre, lent curgătoare, bogate în nutrienţi, în lunile calde.

## „Înfloririle" produse de cianobacterii şi alge

Înflorirea este o dezvoltare rapidă şi masivă a celulelor unei specii, care conferă o culoare distinctă apei. Cercetătorii folosesc termenul de „înflorire algală periculoasă", pentru a desemna populaţiile de cianobacterii şi de alge, de mare densitate, care produc toxine cu impact negativ asupra consumatorilor. Cele mai toxice înfloriri marine sunt produse de alge. Înfloririle algale toxice de apă dulce sunt rare. Aproape toate înfloririle toxice din apa dulce sunt produse de *cianobacterii.*

Înfloririle algelor marine, care produc toxine puternice, au ridicat frecvenţa intoxicaţiilor produse de sursele de hrană de origine marină, la om şi la animale. S-a studiat biochimia unor toxine algale, modificările pe care le determină după ce sunt consumate sau absorbite, dar nu se cunosc condiţiile sintezei de către alge şi nici modalităţile de prevenire a înfloririlor.

Înfloririle algale apar în regiunile cele mai expuse riscului poluării: regiunile de coastă şi de estuar, unde există cel mai mare risc de contact cu omul.

Nu toate îmbolnăvirile umane de natură toxică se datorează toxinelor algale. Unele stări toxice sunt rezultatul consumului unor specii de peşti toxici.

Numeroase specii de cianobacterii produc fenomene de înflorire, în condiţiile poluării apelor cu nutrienţi, în special cu P şi compuşi azotaţi.

Multe înfloriri cu cianobacterii sunt inofensive, până când densitatea celulelor devine suficient de mare pentru a produce moartea peştilor prin consumul $O_2$ dizolvat în apă. Înfloririle produc $O_2$ prin fotoliza apei la lumină, dar îl consumă la întuneric şi de aceea peştii mor în primele ore ale dimineţii.

Scanned with OKEN Scanner

Cianobacteriile şi algele, în timpul înfloririlor, conferă miros şi gust neplăcut apei, colmatează filtrele, iar moluştele îşi pierd valoarea comercială datorită gustului şi mirosului neplăcut.

Înfloririle apar adeseori în lacurile mici artificiale, unde la suprafaţă se formează un strat de apă foarte caldă în care se dezvoltă o masă celulară „spumoasă" cu potenţial toxic înalt pentru animale şi pentru om.

## Toxine produse de cianobacterii

Numărul cianobacteriilor care sintetizează compuşi cu activitate biologică este în continuă creştere. Cianobacteriile sunt o sursă bogată de metaboliţi cu activitate biologică: sintetizează o mare diversitate de metaboliţi secundari (*alcaloizi, poliketide şi peptide neribosomale*), mulţi dintre aceştia fiind foarte *toxici* pentru o largă varietate de organisme, inclusiv pentru om. Unele specii de cianobacterii sintetizează mai multe tipuri structurale de compuşi toxici, alteori sinteza toxinelor are caracter accentuat de specificitate.

Practic, toate înfloririle de apă dulce asociate cu sinteza toxinelor, sunt produse de cianobacterii. Cei mai frecvenţi *compuşi peptidici* sunt *microcistinele* produse de speciile de *Microcystis*.

În tabelul următor sunt redate cianobacteriile şi toxinele pe care le produc.

| Genul* | Toxine produse** |
|---|---|
| Anabaena | Anatoxine, microcystine, saxitoxine, LPS*** |
| Anabaenopsis | Microcistine, LPS |
| Anacystis | LPS |
| Aphanizomenon | Saxitoxine, cilindrospermopsine, LPS |
| Cylindrospermopsis | Cilindrospermopsine, saxitoxine, LPS |
| Hapalosiphon | Microcistine, LPS |
| Lyngbia | Aplisiatoxine, lingbiatoxina, LPS |
| Microcystis | Microcistine, LPS |
| Nodularia | Nodularina, LPS |
| Nostoc | Microcistine, LPS |
| Phormidium (Oscillatoria) | Anatoxina, LPS |
| Planktothrix (Oscillatoria) | Anatoxine, aplisiatoxine, microcistine, saxitoxine, LPS |
| Schizothrix | Aplisiatoxine, LPS |
| Trichodesmium | Neidentificată |
| Umezakia | Cilindrospermopsina, LPS |

* Nu toate speciile unui gen sintetizează acelaşi set de toxine.

** S-a identificat un număr mare de compuşi bioactivi, dar potenţialul toxic al unora pentru animale şi pentru om este bine exprimat.

*** LPS = lipopolizaharid.

Scanned with OKEN Scanner

***Sinteza.*** Nu toate proteinele se sintetizează pe ribosomi. Unele polipeptide, cu mai puţin de 50 de aminoacizi, pot fi asamblate de peptid-sintetaze, ca şi alţi compuşi precum acizii graşi, a căror sinteză este catalizată de alte sintetaze.

Produsele peptidice de *sinteză neribosomală** includ ciclosporina (cu acţiune imunosupresoare) şi antibiotice ca gramicidina S, tirocidina A şi surfactinele. O structură modulară a peptid-sintetazelor determină alungirea secvenţială a catenei peptidice, prin adausul de aminoacizi specifici.

* Sinteza peptidelor pe cale neribosomală are loc la procariote şi eucariotele inferioare şi se bazează pe principiul *matriţei cu S* (thiotemplate), catalizată de complexe enzimatice mari multifuncţionale, denumite ***peptid-sintetaze***, care sunt organizate în ***module*** (un modul de iniţiere a sintezei şi mai multe module de alungire a catenei peptidice). Fiecare modul este alcătuit din mai multe ***domenii***, care determină alungirea catenei polipeptidice prin adăugarea succesivă a aminoacizilor.

Modulele au un model comun de organizare care le permite activarea aminoacidului fixat şi realizarea unei legături peptidice, ca şi modificarea aminoacidului fixat prin reacţii de epimerizare sau N-metilare.

S-a demonstrat experimental că un modul de alungire trebuie să posede cel puţin 4 domenii:

– un domeniu de *adenilare* (A) cu activitate de peptid-sintetază care fixează aminoacidul şi îl activează printr-o reacţie de adenilare;

– un domeniu de *tioesterificare* (T sau PCP-*peptidyl carrier protein*) care menţine peptidul nascent asociat cu sintetaza pe întreaga durată a sintezei prin intermediul unei legături tioesterice;

– un domeniu de *condensare* (C) prin care sintetaza catalizează formarea legăturilor peptidice;

– un domeniu *specific* (Te) cu activitate de tioesterază care permite eliberarea peptidului de complexul sintetazei, după terminarea sintezei.

Spre deosebire de calea de sinteză proteică clasică, ribosomală, care utilizează doar 21 de aminoacizi (20 esenţiali şi selenocisteina), sinteza non-ribosomală poate utiliza peste 300 de aminoacizi (de exemplu, D-aminoacizi, aminoacizi N-metilaţi etc.), însă peptidele sintetizate nu pot depăşi 48 de aminoacizi.

Peptid-sintetazele, ca şi alte complexe enzimatice (de exemplu, poliketid-sintetazele), sunt interesante datorită posibilităţii utilizării lor în biosinteza produselor nenaturale.

Majoritatea peptidelor neribosomale sintetizate de microorganisme sunt clasificate ca *metaboliţi secundari*, adică rareori au rol în metabolismul primar, în creştere sau în reproducere, dar sinteza lor a evoluat cu anumite beneficii pentru organismul producător.

Toxinele produse de cianobacteriile de apă dulce sunt grupate în *hepatotoxine* şi *neurotoxine*.

*Hepatotoxinele* sunt reprezentate de *microcistine, nodularine* şi de *cilindrospermina*, produse de *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Nostoc, Nodularia, Cylindrospermopsis, Aphanizomenon* şi *Umezakia*.

*Neurotoxinele* produse de cianobacteriile de apă dulce sunt *anatoxinele* şi *saxitoxinele*.

### *Toxine alcaloidice*

*Anatoxinele* sunt un grup de alcaloizi neurotoxici produşi de cianobacterii din genurile *Anabaena, Oscillatoria* şi *Aphanizomenon*. S-au descris 3 anatoxine: *anatoxina-a* şi *homoanatoxina-a* sunt amine secundare, iar *anatoxina-a(s)* este un

Scanned with OKEN Scanner

ester-fosfat al structurii ciclice N-hidroxiguanina (fig. 40). Primele două acţionează asupra membranei postsinaptice a joncţiunii neuromusculare şi depolarizează sinapsa. Ambele se leagă la nivelul receptorului pentru *nicotin-acetilcolină* şi sunt neurotoxine puternice, producând moartea rapidă a mamiferelor prin oprirea respiraţiei.

Toxicitatea acestor compuşi (DL50) variază de la 20 µg/kg (administrare intraperitoneală la şoarece) pentru anatoxina-a(s), la 200–250 µg/kg pentru anatoxina-a şi homoanatoxina-a, fiind mai toxice decât microcistinele.

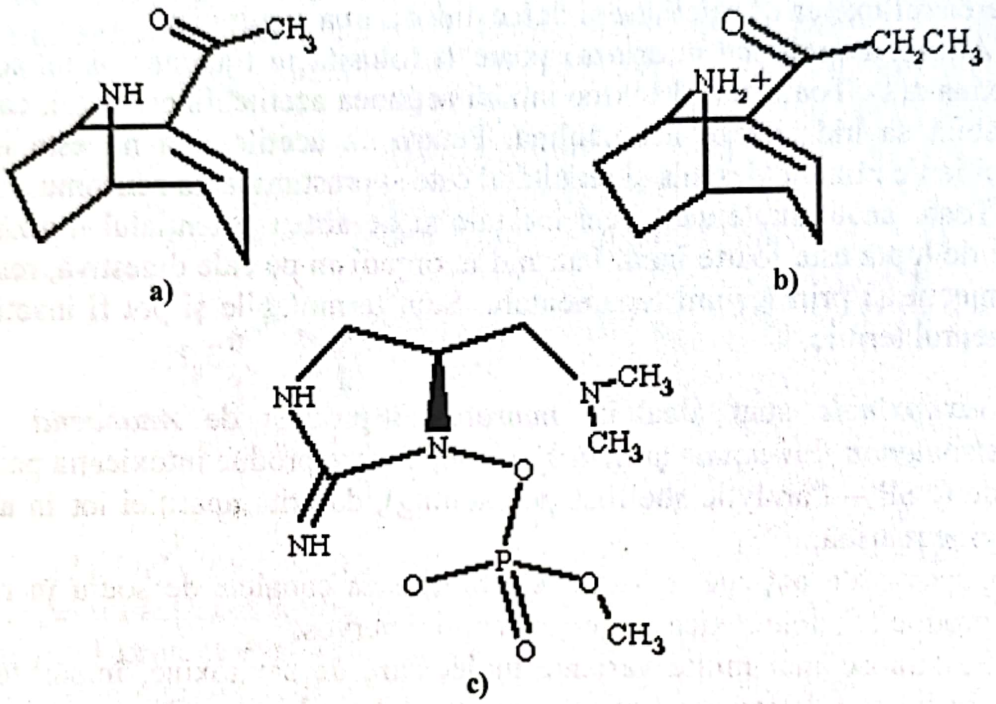



Fig. 40 – Structura chimică a anatoxinelor:
anatoxina-a (a), homoanatoxina-a (b) şi anatoxina-a(s) (c).

Anatoxina-a şi homoanatoxina-a sunt alcaloizi neurotoxici cu moleculă mică, identificaţi iniţial la cianobacteria de apă dulce *Anabaena flos-aquae*.

*Anatoxina-a* este un alcaloid neurotoxic biciclic, foarte solubil în apă. Toxina se leagă de receptorii de acetilcolină şi produce stimularea lor prin inhibiţia ireversibilă a acetilcolinesterazei. Toxina acţionează rapid şi simptomele încep să apară la mai puţin de 5 minute după ingestie. De aceea se mai numeşte şi factorul morţii rapide (*v*ery *f*ast *d*eath *f*actor-VFDF). Simptomele constau în apariţia spasmelor musculare, paraliziei, oprirea respiraţiei. Moartea survine în minute sau ore, în funcţie de doză. Pentru om, doza mortală este estimată la 5 mg. Nu există tratament specific. Toxina este sensibilă la căldură, lumină şi baze. Detectarea şi identificarea acestui compus este posibilă numai în laboratorul analitic. Anatoxina-a naturală este (+)-diastereoizomer, cu potenţial toxic înalt. Toxina poate fi sintetizată chimic, într-un amestec racemic.

*Homoanatoxina-a* se aseamănă structural cu anatoxina-a. A fost obţinută prin sinteză chimică şi ulterior s-a identificat ca fiind produsă de *Oscillatoria formosa*.

Scanned with OKEN Scanner

*Anatoxina-a(s)* este mai puternică şi este produsă de *Anabaena flos-aquae*. Este inhibitoare a acetilcolinesterazei pentru că se leagă de enzimă şi o face incapabilă să hidrolizeze acetilcolina. Deoarece acetilcolina nu este inactivată, canalul rămâne deschis şi anihilează funcţia contractilă prin epuizarea resurselor energetice. Doza letală pentru şoarece este de 20–40 µg/kg. Acţiunea sa este asemănătoare compuşilor organofosforici activi asupra sistemului nervos (gazul sarin), care inhibă colinesterazele prin fosforilarea situsului activ. Este *singurul compus organic fosforilat natural* cunoscut. Administrarea intraperitoneală la şobolan produce semne de suprastimulare colinergică: hipersalivaţie, lăcrimare, pierderea reflexelor de micţiune şi defecaţie, oprirea respiraţiei.

Atropina (produce midriaza) poate fi folosită în tratamentul intoxicaţiei cu anatoxina-a(s). Toate cele 3 toxine inhibă acţiunea acetilcolinesterazei, care devine incapabilă să hidrolizeze acetilcolina. Pentru că acetilcolina nu este inactivată, canalul ionic rămâne deschis şi rezultatul este suprastimularea neuromusculară.

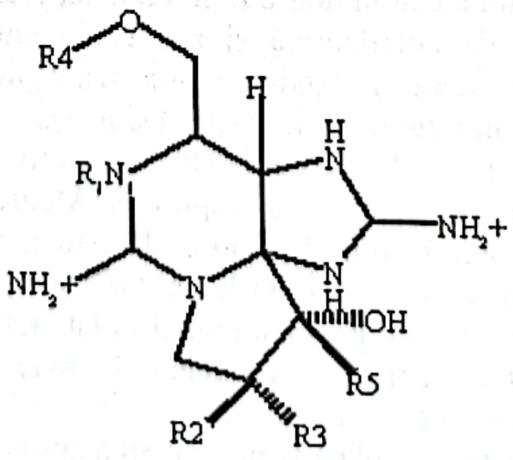
Toate anatoxinele au efecte mortale şi de aceea potenţialul utilizării lor ca toxine de luptă este foarte înalt. Pătrund în organism pe cale digestivă, respiratorie, prin injecţie şi prin leziuni tegumentare. Sunt termolabile şi pot fi inactivate prin tratamentul termic.

*Saxitoxinele* sunt alcaloizi *neurotoxici* produşi de *Anabaena circinalis, Aphanizomenon flos-aquae* şi *Lyngbya wolleii*, care produc intoxicaţia paralitică cu moluşte (PSP – *P*aralytic *s*hellfish *p*oissoning), datorită apariţiei lor în alimentele de origine marină.

Ca mod de acţiune, saxitoxinele blochează canalele de sodiu în neuroni şi astfel produc efectele toxice asupra sistemului nervos.

Se cunosc mai multe variante moleculare de saxitoxine, împărţite în două grupe, în funcţie de structură sau de organismul producător. Cele care au o singură grupare sulfat sunt denumite *goniotoxine* (G), iar cele cu două grupe sulfat sunt *saxitoxine C*.

Saxitoxinele sunt molecule foarte toxice: DL50 este 10 µg $kg^{-1}$ (injectare intraperitoneală) la şoarece.

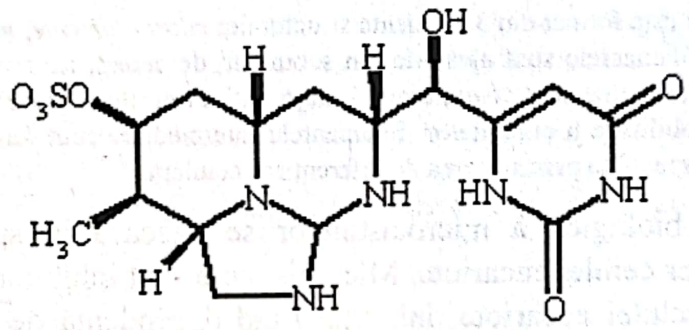



Structura moleculară a saxitoxinei

Scanned with OKEN Scanner

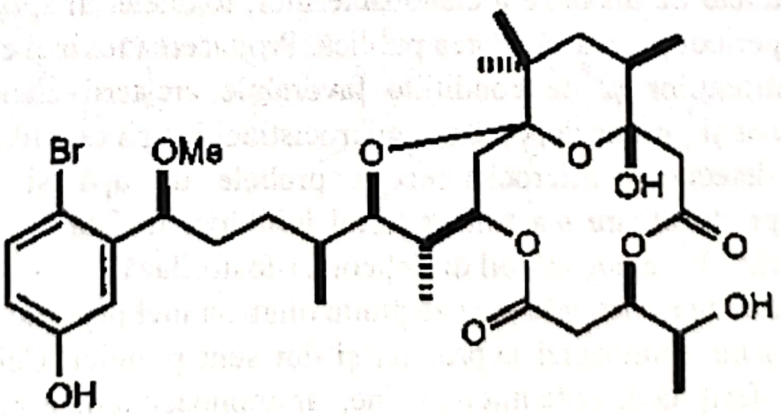
Se cunosc 20 de analogi ai saxitoxinelor, care pot fi grupaţi astfel: *saxitoxine, goniotoxine C, toxine C, decarbamoil-saxitoxine* şi toxine *Lyngbya wolleii*. Cea mai puternică este saxitoxina, iar goniotoxina C şi toxinele C sunt mai puţin toxice.

*Cilindrospermopsina*, iniţial considerată ca fiind sintetizată numai de *Cylindrospermopsis raciborskii*, s-a identificat ulterior şi la *Aphanizomenon ovalisporum* şi *Umezakia natans*. Toxina este un *alcaloid ciclic* ca şi microcistinele şi produce efecte toxice în primul rând asupra ficatului, dar şi în alte organe. DL50 după administrarea intraperitoneală la şoarece este de circa 200 μg $kg^{-1}$, ceea ce o plasează în categoria toxinelor potente ale cianobacteriilor. Acţionează la nivelul ficatului unde determină depunerea grăsimilor şi necroza celulară. Într-o măsură mai mică, efectele toxice se produc asupra rinichilor şi splinei.




Cilindrospermopsina

*Aplisiatoxinele* sunt sintetizate de cianobacteria marină *Lyngbia* şi sunt cunoscute pentru acţiunea lor dermotoxică, producând inflamaţia tegumentului, dar şi pentru rolul promotor al neoplaziilor. Aplisiatoxinele şi debromoaplisiatoxina sunt produse de cianobacteriile filamentoase *Schizothrix calcicola* şi *Oscillatoria nigroviridis*.




Debromoaplisiatoxina

### *Peptide ciclice*

*Microcistinele* sunt un grup de *heptapeptide ciclice*, alcătuite din 7 aminoacizi, produse de mai multe genuri de cianobacterii, cea mai largă răspândire

având-o *Microcystis*, de la care toxinele şi-au luat numele. Sunt solubile în apă şi letale pentru multe organisme aquatice. Sunt produse şi de alte genuri: *Oscillatoria, Anabaena, Nostoc*.

S-au identificat 65 de izoforme ale acestor compuşi peptidici, care variază prin gradul de metilare, hidroxilare, epimerizare, prin secvenţa aminoacizilor şi prin gradul de toxicitate. După ce ajung în ţesuturi sau în celule, microcistinele interferă cu numeroase procese esenţiale pentru viaţa celulei şi au efecte dăunătoare pentru organismele superioare şi pentru om.

Microcistinele sunt transportate în ficat, iar în hepatocite efectul toxic constă în hiperfosforilarea microfilamentelor citoscheletului*, inclusiv a celor de citocheratină.

* Citoscheletul este format din 3 elemente structurale: *microfilamente, microtubuli şi filamente intermediare*. Microfilamentele sunt alcătuite din subunităţi de *actină*, iar microtubulii sunt formaţi din *tubulină*. Aceste elemente sunt comune marii majorităţi a tipurilor celulare. Ele au rol structural, de transport şi de mobilizare a organitelor. Filamentele intermediare sunt formate din subunităţi de *citocheratină* şi sunt specifice pentru starea de diferenţiere celulară.

Activitatea biologică a microcistinelor se bazează în special pe inhibiţia protein-fosfatazelor celulei eucariote. Microcistinele sunt inhibitori ai fosfatazelor de tip 1 şi 2A ale celulei eucariote, inhibiţia fiind dependentă de variaţii structurale particulare. Pot să activeze fosfolipaza $A_2$ şi ciclooxigenaza în hepatocite, iar în macrofage induc sinteza TNF-α şi a IL-1. Aceste funcţii, împreună cu hiperfosforilarea ADN au implicat microcistinele ca agenţi care favorizează carcinomul hepatocelular.

De obicei, microcistinele rămân legate de celulă şi de aceea concentraţia intracelulară este mare.

În perioadele de înflorire a cianobacteriilor, toxinele, în special microcistina reprezintă un pericol pentru sănătatea publică. Producerea toxinei este favorizată de abundenţa nutrienţilor şi de condiţiile favorabile creşterii cianobacteriilor. De aceea, detectarea şi prognoza prezenţei microcistinei în apă este foarte importantă.

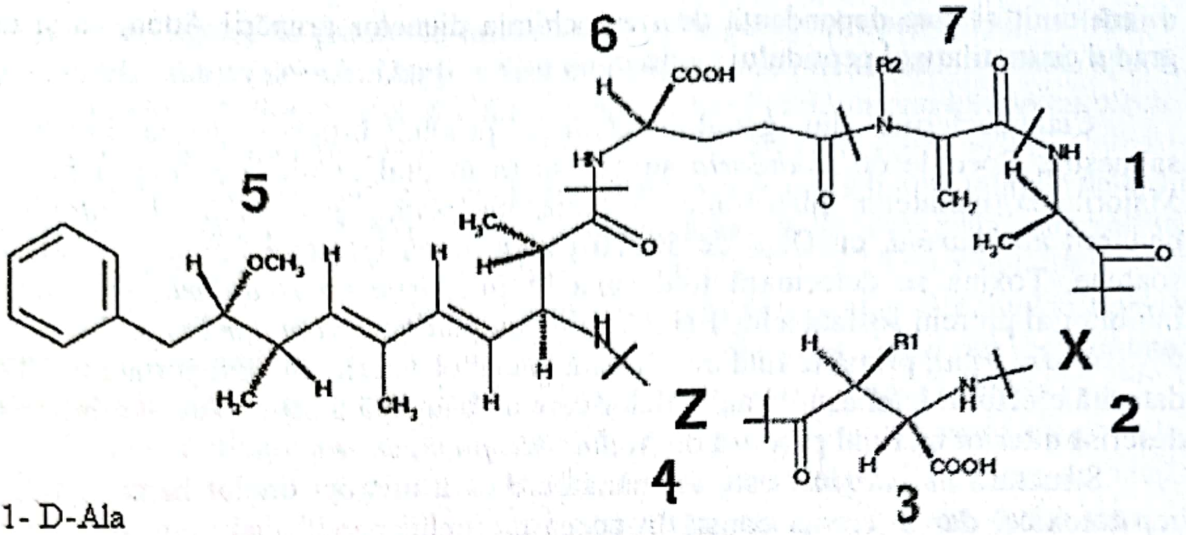
Pentru detectarea microcistinei în probele de apă şi în tulpinile de cianobacterii producătoare s-a folosit testul inhibiţiei fosfatazei. Testul constă în inhibiţia eliberării $P^{32}$ acidosolubil din glicogen-fosforilază.

Structural, microcistinele sunt alcătuite dintr-un inel peptidic cu 7 aminoacizi, dintre care 5 sunt aminoacizi neproteici şi doi sunt proteici. Cei doi aminoacizi proteici sunt diferiţi la diferite microcistine, iar aminoacizii neproteici sunt prezenţi relativ constant la diferite microcistine.

În modelul general de structură al microcistinelor, poziţiile aminoacizilor variabili sunt notate cu X şi cu Z (fig. 41).

Microcistinele sunt desemnate prin litera de cod a aminoacidului prin care diferă de celelalte. De exemplu, cea mai comună şi cea mai toxică microcistină, LR, conţine aminoacizii Leucină (L) şi Arginină (R) în poziţiile variabile (fig. 42).

Scanned with OKEN Scanner




1- D-Ala
2-L-aminoacid variabil
3-Acid-D-metilaspartic
4-L-aminoacid variabil
5-acid 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-4,6-dienoic (Adda)
6-D-Glu
7-N-metildehidroalanina

Fig. 41 – Modelul general al structurii microcistinelor.

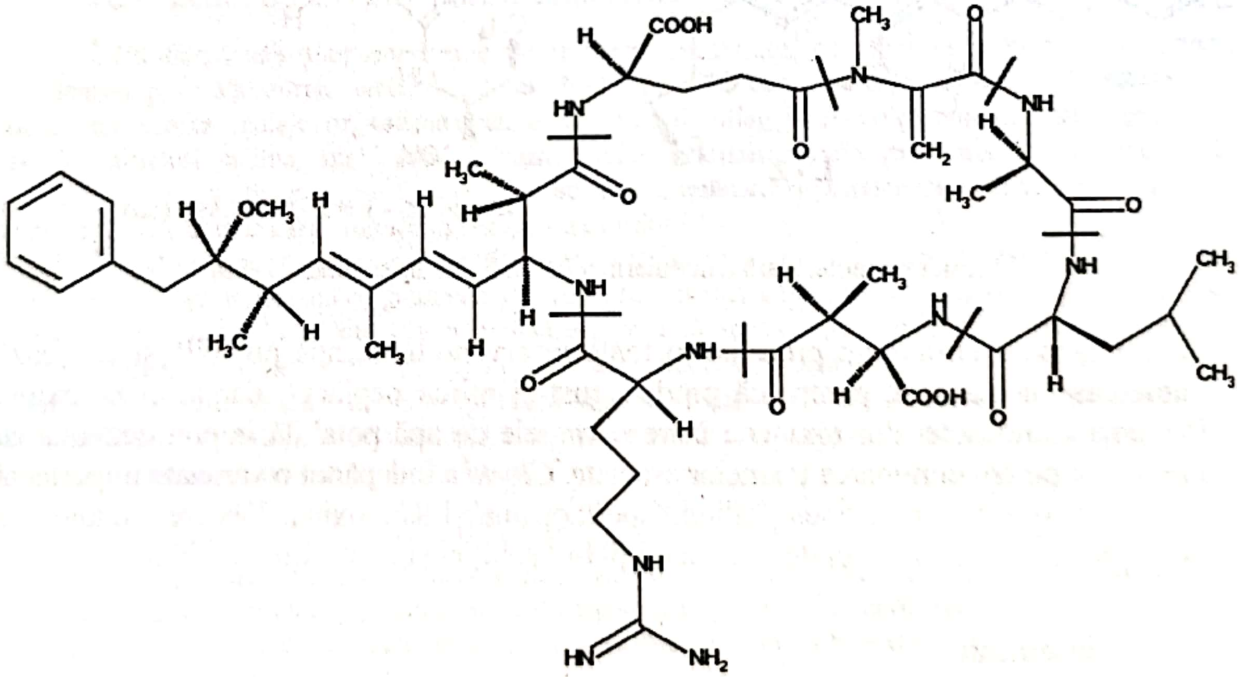


Fig. 42 – Structura moleculară a microcistinei. Cei doi aminoacizi variabili sunt leucina şi arginina.

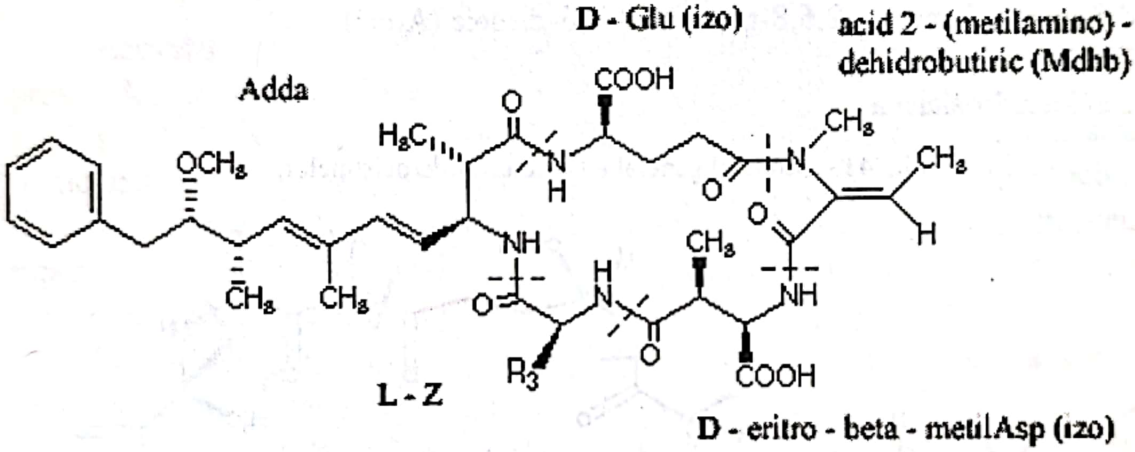
Aminoacidul neobişnuit „Adda" s-a dovedit foarte util pentru studiul microcistinelor, deoarece conferă moleculei proprietatea de a absorbi lungimea de undă de 238 nm. Aminoacidul Adda conferă totodată toxicitate moleculei şi este important pentru legarea toxinei de *protein fosfataze*. Toxicitatea moleculelor

diferă mult şi este dependentă de stereochimia dienelor grupării Adda, ca şi de gradul de metilare al peptidului ciclic.

Cianobacteriile din genul *Nodularia* produc înfloriri toxice în apele salmastre. Speciile de *Nodularia* se găsesc în mediul bentic, perifitic şi în sol. Majoritatea izolatelor planctonice produc un *pentapeptid ciclic hepatotoxic*, denumit *nodularină*, cu $DL_{50}$ de 50–70 µg/kg, după injectare intraperitoneală la şoarece. Toxina se detectează totdeauna în înfloririle cu *Nodularia* şi este un inhibitor al protein-fosfatazelor 1 şi 2A, fiind un puternic *promotor* tumoral.

*Nodularina*, prima toxină evidenţiată la cianobacterii, a fost raportată în 1878 datorită efectului letal asupra animalelor care au băut apă dintr-un lac cu o înflorire descrisă ulterior ca fiind produsă de *Nodularia spumigena*.

Structura *nodularinei* este asemănătoare cu a microcistinelor heptapeptidice hepatotoxice, dar diferenţa constă în aceea că inelul peptidic al nodularinei este format numai din 5 aminoacizi. Ambele sunt hepatotoxice şi au acelaşi mecanism de acţiune: inhibă protein- fosfatazele. Valorile DL50 sunt asemănătoare.




Structura moleculară a nodularinei (după Rinehart şi colab., 1988)

Cianobacteriile sunt prezente în toate rezervoarele de apă potabilă şi cauzează numeroase neajunsuri, pentru că produc gust şi miros neplăcut, dar şi cianotoxine. Prezenţa cianobacteriilor toxigene în rezervoarele de apă potabilă impun dezvoltarea metodelor pentru eliminarea toxinelor asociate. *Clorul* a îndepărtat o varietate importantă de cianotoxine: microcistinele, cilindrospermopsina şi saxitoxina. Fiecare cianotoxină necesită parametri specifici de tratament: pH-ul soluţiei şi clorul liber rezidual.

## Algatoxine

Algele sunt organisme cu o importanţă economică considerabilă şi pe măsura accentuării deficitului global al resurselor de hrană se apreciază că li se va atribui o semnificaţie crescândă. Majoritatea speciilor de alge (fitoplanctonul) nu sunt toxice şi au rolul de producători primari de energie la baza lanţului trofic, fără de care organismele superioare n-ar putea exista.

Scanned with OKEN Scanner

Rolul algelor în patologia umană, ca agenţi patogeni oportunişti, ca iritanţi tegumentari sau ca sensibilizanţi, a fost evidenţiat în ultimele decade. Unele specii algale, în special *diatomee* şi *dinoflagelate* au tulpini care produc toxine cu efecte uneori letale în timpul „înfloririi".

Algele toxice care cresc în apele poluate omoară peştii şi alte animale de apă, produc îmbolnăviri prin intoxicare şi chiar moartea la om prin intermediul ***algatoxinelor.***

Unele specii, ca *Alexandrium tamarense* (dinoflagelate) şi *Pseudonitzschia australis* (diatomee) produc toxine care sunt eliberate când algele sunt consumate. Altele, ca *Pfiesteria piscicida,* folosesc exotoxinele pentru a omorî prada.

Toxinele algale sunt reprezentate de *hepatotoxine* sau *neurotoxine* potente, care pot fi transferate prin lanţul trofic în care pot omorî alte forme de viaţă: zooplanctonul, moluşte, peşti, păsări, mamifere marine şi chiar omul care le consumă indirect. Riscul producerii accidentelor toxice de origine algală creşte în timpul fenomenelor de înflorire.

Fenomenele de înflorire algală sunt produse de specii de dinoflagelate* şi de diatomee, în condiţiile poluării apelor cu nutrienţi, în special cu P şi compuşi azotaţi. Frecvent, celulele algale se concentrează de-a lungul ţărmului prin acţiunea vântului şi a valurilor. Înfloririle modifică culoarea şi mirosul apei, dar mai ales pot fi toxice dacă sunt ingerate de animalele marine, domestice sau de către om.

Fenomenul de înflorire poartă denumirea comună de „maree roşie"**.

*Dinoflagelatele sunt organisme unice printre eucariote, deoarece cromosomii lor rămân condensaţi pe toată durata ciclului celular, în contrast cu despiralizarea şi relaxarea cromatinei observată la toate celelalte organisme eucariote. În plus, dinoflagelatele nu au proteine histonice tipice şi nici structuri nucleosomale care definesc nucleii celorlalte organisme eucariote. Cromosomii dinoflagelaelor conţin o serie de proteine bazice, asemănătoare histonelor. Funcţia lor nu este cunoscută, dar ar putea fi implicate în reglarea transcrierii.

** Celulele algale conţin un pigment roşietic şi ating densităţi aşa de mari încât apa se colorează în roşu. Termenul de „maree roşie" este greşit pentru că înflorirea nu se asociază cu mareea. De obicei „mareele roşii" nu sunt periculoase pentru că speciile de dinoflagelate toxice nu ating niciodată densitatea necesară schimbării culorii apei. Sunt de asemenea cunoscute „mareele brune", cauzate de speciile de alge brune. Majoritatea înfloririlor sunt de scurtă durată. O arie „înflorită" va redeveni sigură în 4–14 zile. Moluştele toxice care au concentrat toxinele pot să necesite până la un an pentru a se epura la un nivel lipsit de pericol.

Altă cale prin care algele netoxice pot produce mortalitate piscicolă este caracteristică diatomeei *Chaetoceros* (*C. concavicomis* şi *C. convolutus*), letală pentru salmonide la densitatea de 5 celule/ml, dar produce leziuni cronice la densitatea de 2 celule/ml. Aceste alge au spini care irită şi lezează epiteliul branhial şi pătrund în membranele branhiilor. Este stimulată secreţia unui mucus abundent care acoperă branhiile şi determină sufocarea prin diminuarea oxigenării. Se produc hemoragii capilare şi infecţii secundare.

### *Alge producătoare de toxine*

*Dinoflagelatele* marine reprezintă o componentă importantă a fitoplanctonului, producătoare ale fenomenului de înflorire în ariile de coastă ale oceanului. Sunt

Scanned with OKEN Scanner

alge microscopice unicelulare, cu flagel. Unele sunt fotosintetizante, altele sunt prădătoare, iar altele se hrănesc atât fotosintetic cât şi prin prădare. Dintre cele circa 2000 de specii, circa 30 produc *neurotoxine* ce determină intoxicaţii la persoanele care consumă hrană marină contaminată. Deşi sunt fotosintetizante, unele ca *Pfiesteria*, sunt mai asemănătoare cu animalele pentru că-şi dobândesc energia, total sau parţial, prin prădarea altor organisme. Pe lângă formarea unor maree roşii, unele specii de dinoflagelate produc o varietate de *toxine* denumite *saxitoxine* (STX), toate fiind compuşi chimici *perhidropurinici*, al căror efect este „intoxicaţia paralitică cu moluşte" (paralytic shellfish toxins – PST). Circa 75% dintre speciile algale toxice sunt dinoflagelate.

*Alexandrium* este un dinoflagelat care produce toxine puternice cu acţiune rapidă. După ingestia moluştelor contaminate, de cele mai multe ori survine moartea, dar cazurile sunt rare. Înfloririle marine produc mortalitate la animale (peşti, păsări de apă, mamifere marine), în special în apele de ţărm, unde se face deversarea substanţelor poluante.

*Karenia brevè (Gymnodinium breve)* provoacă otrăvirea neurotoxică cu moluşte (NSP – *n*eurotoxic *s*hellfish *p*oissoning). În timpul înfloririlor, toxinele omoară nevertebrate, peşti, păsări, mamifere marine şi pot să fie antrenate în aerosoli, producând tulburări respiratorii la practicanţii surf-ului. *Karenia* creşte departe de ţărm, pe platoul continental la concentraţii scăzute de nutrienţi, dar curenţii de apă transportă înfloririle algale spre ţărm.

*Pfiesteria piscicida* este un dinoflagelat toxic, ce produce leziuni mortale la peşti. Această specie este heterotrofă şi stadiile flagelate ale ciclului de viaţă au vacuole digestive mari. Se hrăneşte fagocitând celule întregi de diatomee. În mod obişnuit este netoxică şi se hrăneşte cu alge şi bacterii în apă şi în sedimentele estuarelor. Produce înfloriri toxice efemere şi este agentul cauzal a 30% din mortalitatea peştilor.

*Pfiesteria* devine toxică numai în prezenţa peştilor. Toxicitatea este declanşată de secreţiile sau de excrementele peştilor. La contactul cu aceste produse, celulele de *Pfiesteria* îşi schimbă morfologia şi eliberează o neurotoxină puternică, cu efecte letargice.

Alte toxine lezează tegumentul peştilor şi produc sângerarea. Contactul cu ţesuturile stimulează toxigenitatea şi formarea gameţilor, care fuzionează. După moartea gazdei, alga revine la înmulţirea prin zoospori asexuaţi.

La om, consumul apei care conţine toxina de *Pfiesteria* poate produce pierderea temporară a memoriei, stare de confuzie mentală, tulburări respiratorii, gastrointestinale şi leziuni tegumentare.

*Dinophysis* produce o toxină (acidul okadaic) cu efecte gastrointestinale, care se declanşează la 30 min.– câteva ore după consumul moluştelor contaminate.

*Gonyaulax* şi *Gymnodinium* produc o toxină neurotropă, ce provoacă paralizii. Pericolul intoxicării paralitice, creşte în sezoanele în care se produc „înfloriri" cu aceste dinoflagelate. Când densitatea celulelor algale creşte la 50 000/ml, apa se colorează. Fenomenul este cunoscut sub denumirea de „mareea roşie" şi indică abundenţa neurotoxinei în moluştele zonei (midii, stridii).

Scanned with OKEN Scanner

Densităţile celulare mici, care nu schimbă culoarea apei, sunt totuşi periculoase. Ingestia a 0,5 mg toxină, poate fi fatală pentru om. Cantitatea se găseşte în sute de grame de moluşte şi este stabilă după îngheţare sau prelucrare obişnuită. Nu se cunoaşte antidotul faţă de neurotoxina dinoflagelatelor. Moartea poate să survină în 3–12 ore. Pentru reducerea nivelului toxinei se provoacă reflexul de vomă.

Un număr restrâns de alge are implicaţie directă în patologia umană.

***Diatomeele*** sunt alge microscopice unicelulare care secretă şi sunt închise într-un perete celular rigid ce formează o teacă rotundă până la forma alungită. Teaca este alcătuită din două jumătăţi aproape identice care au complementaritate de formă, ca o cutie cu capacul ei. Peretele celular conţine celuloză dar este alcătuit în primul rând din compuşi ai Si, care îi conferă rigiditate. Citoplasma conţine clorofilă, dar şi xantofilă cu nuanţă de galben, care le conferă culoarea galben-închisă. Reproducerea se face prin diviziune. Cele două jumătăţi ale tecii se separă şi fiecare secretă jumătatea complementară pentru închiderea tecii. Diviziunea continuă până când se atinge o dimensiune critică. Periodic, are loc reproducerea sexuată pe calea fertilizării gameţilor haploizi şi rezultă celule cu dimensiunile originale ale speciei.

*Pseudonitzschia* este o diatomee care sintetizează *acidul domoic*, o neurotoxină ce produce intoxicaţia amnezică cu moluşte (ASP- ***a***mnesic ***s***hellfish ***p***oisoning), ce pericliteză viaţa. Cazurile de intoxicaţie medie se manifestă în 24 de ore de la consumul moluştelor contaminate. Apare starea de rău general, vomă, diaree, dureri abdominale. În cazurile mai severe, simptomele neurologice se instalează în decurs de 48 de ore după consumul moluştelor toxice şi au gravitate dependentă de doză: dureri de cap, halucinaţii, confuzie, pierderea memoriei pe timp scurt, dificultăţi respiratorii, atac cerebral şi chiar moarte. Majoritatea înfloririlor nu sunt asociate cu deversarea substanţelor nutritive, ci cu schimbări naturale sezoniere: curenţi de apă, temperatură, salinitate.

### *Structura chimică a algatoxinelor*

Diversitatea toxinelor algale cu impact asupra stării de sănătate a omului este o reflectare a marii diversităţi a capacităţilor de biosinteză a algelor eucariote. Toxinele algelor verzi sunt *metaboliţi secundari*, adică sunt neesenţiali pentru metabolismul de bază şi pentru creştere.

Toxinele dinoflagelatelor sunt *polieteri* sintetizaţi pe calea *poliketid-sintazei*, prin adăugarea secvenţială a acetatului şi aparţin la două grupe structurale:

– *molecule lineare*, de tipul acidului okadaic;
– *molecule macrociclice* fuzionate, cu aspect scalariform.

Metaboliţii secundari sunt comuni la bacterii, la eucariotele inferioare şi la plante. Mulţi dintre ceştia sunt consideraţi ca având rolul unor arme chimice, care le conferă avantaj competitiv faţă de alte specii. Alţii pot avea rol în comunicarea şi

Scanned with OKEN Scanner

semnalizarea chimică sau sunt relicve evolutive. Toxigenitatea nu este o trăsătură general-conservată a algelor, pentru că de cele mai multe ori, specii înrudite cu cele toxigene, pot să nu fie toxigene. De aceea, avantajul selectiv al sintezei toxinei este greu de stabilit. Genele codificatoare ale toxinei nu s-au identificat la nici-o specie şi de aceea este imposibil să se determine dacă la speciile netoxigene, gena codificatoare este prezentă în stare inactivă.

După ce trec prin lanţul trofic marin, toxinele pot produce îmbolnăviri umane prin consumul moluştelor bivalve contaminate. Bivalvele care se hrănesc cu dinoflagelate, transferă toxinele de la lamelele branhiale, la organele digestive, unde le concentrează.

Toxinele algale sunt diverse structural şi funcţional. Multe dintre ele derivă pe căi biosintetice particulare.

Dinoflagelatele sintetizează o varietate de *toxine polieterice,* sintetizate pe calea poliketid-sintetazei, prin adugarea secvenţială a acetatului.

Toxinele algale cu impact asupra sănătăţii umane pot fi împărţite în funcţie de efectele chimice dominante, în *neurotoxine* şi *hepatotoxine*.

Structura de bază a neurotoxinelor (PSP – *p*aralytic *s*hellfish *p*oissoning) este un schelet *tetrahidropurinic*, cu două funcţii guanidinice.

*Saxitoxinele* sunt cele mai reprezentative *neurotoxine* cu efecte paralizante. Ele formează un grup de cel puţin 22 agenţi blocanţi ai transmiterii neuromusculare. Saxitoxinele se împart în mai multe grupe în funcţie de structură sau de organismul producător. În funcţie de substituţiile care au loc în structura de bază, saxitoxinele se împart în 4 grupe:

– carbamat;
– N-sulfocarbamil. Apariţia grupărilor N-S este rară în moleculele naturale şi poate reprezenta un mecanism nou de biosinteză;
– decarbamil;
– deoxicarbamil.

Cele care au o singură grupare sulfat sunt denumite *goniotoxine* (G), iar cele cu două grupe sulfat sunt *saxitoxine C*. Substituţiile produc schimbări majore ale toxicităţii. Cele mai toxice sunt carbamaţii. Cele cu substituienţi decarbamil sunt intermediare, iar cele sulfocarbamil au toxicitatea cea mai scăzută.

Saxitoxinele sunt *compuşi triciclici*, a căror structură de bază este înrudită cu a tetrodotoxinei. Conţin două grupări guanidinice (fig. 43). La pH fiziologic, primul grup guanidinic are sarcină pozitivă, iar al doilea grup este parţial deprotonat. Datorită naturii sale polare, molecula de STX se dizolvă uşor în apă şi în alcoolii inferiori, dar este insolubilă în solvenţii organici. Este stabilă în soluţie la pH neutru şi acid chiar la temperaturi înalte, dar este inactivată de baze.

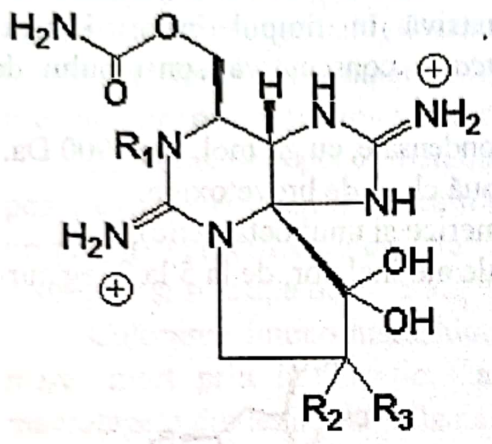
Se sugerează posibilitatea ca saxitoxinele să fie produse autonom de bacteriile asociate tecii dinoflagelatelor.

Saxitoxinele sunt molecule foarte toxice: DL50 este 10 $\mu g\ kg^{-1}$ (injectare intraperitoneală) la şoarece.

Scanned with OKEN Scanner

Compoziţia toxinei în ţesuturile bivalvelor poate să difere mult de cea găsită la dinoflagelatele ingerate. Capacitatea de a metaboliza toxinele PSP variază mult la diferite moluşte. Derivaţii N-sulfo-carbamil – care reprezintă majoritatea toxinelor la dinoflagelate – pot fi convertiţi metabolic la decarbamil, cu potenţial toxic superior.

Căile de biosinteză s-au identificat prin studii cu precursori radiomarcaţi, care arată că atomii de C din poziţiile 1–12 rezultă prin condensarea acetatului cu arginina.



| STX | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ |
|---|---|---|---|
| STX | H | H | H |
| GTX-II | H | H | $OSO_3^-$ |
| GTX-III | H | $OSO_3^-$ | H |
| NeoSTX | OH | H | H |
| GTX-I | OH | H | $OSO_3^-$ |
| GTX-IV | OH | $OSO_3^-$ | H |

Fig. 43 – Structura chimică a saxitoxinelor.
STX = saxitoxina, NeoSTX = neosaxitoxina, GTX = goniotoxina.

Saxitoxinele sunt alcaloizi neurotoxici care produc sindromul intoxicaţiei paralitice cu moluşte (paralitic shellfish poisoning = PSP), datorită apariţiei lor în alimentele de origine marină.

*Mecanismul de acţiune*. Saxitoxinele blochează canalele de sodiu în neuroni şi astfel produc efectele toxice asupra sistemului nervos.

Saxitoxinele se leagă specific şi selectiv de canalele de Na din membrana neuronilor şi blochează fizic deschiderea canalului, împiedicând trecerea în ambele sensuri a cationilor de Na. Deoarece transmiterea neuronală a impulsurilor este dependentă de depolarizarea interiorului celulei, potenţialele de acţiune sunt stopate. Afinitatea de legare este proporţională cu nivelul toxicităţii. Canalul de Na are rol esenţial în transmiterea impulsului în sinapsele neuronale şi neuromusculare. Astfel, diferitele funcţii ale organismului, inclusiv respiraţia, sunt deteriorate.

Saxitoxinele acţionează asemenea toxinei botulinice: ca un agent agonist cholinergic, ce inhibă eliberarea acetilcolinei în sinapsele sistemului nervos periferic. Moleculele de toxină fiind *polare*, nu pot să traverseze bariera sânge-creier. De aceea, situsul primar de acţiune este *joncţiunea neuromusculară*. Astfel se explică efectul rapid (în mai puţin de o oră) şi apariţia simptomelor clasice ale PSP: furnicături şi amorţeli ale zonei periorale şi extremităţilor, pierderea coordonării motorii, somnolenţă, incoerenţă, iar la doze mari – paralizia muşchilor respiratorii.

Scanned with OKEN Scanner

Doza letală la om este de 1–4 mg. Simptomele clinice apar la 0,72 mg toxină ingerată, iar cazurile grave sunt produse de ingestia a 1,0–3,6 mg. Saxitoxina se elimină din sânge în mai puţin de 24 de ore, prin urină, chiar în formele grave ale intoxicaţiei. Nu există antidot la PSP. Anticorpii monoclonali specifici, *in vivo* şi *in vitro* sunt protectori într-o oarecare măsură prin neutralizarea toxinei. 4-aminopurina, blocant al canalului de K, reversază semnificativ efectele toxicozei la şobolan, sugerând că poate fi folosit ca antidot al PSP.

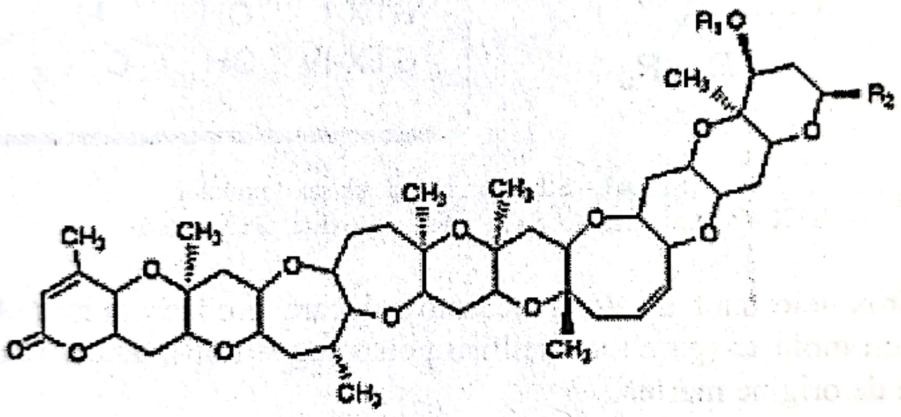
*Neurotoxinele concentrate de moluşte* (NST) sunt toxine policiclice, denumite generic *brevetoxine,* produse de dinoflagelatul *Karenia brevis* (*Gymnodinium breve).* Toxinele produc moarte piscicolă masivă în timpul înfloririi algei producătoare. La om, efectul este *neurointoxicaţia* consecutivă consumului de moluşte (NSP – *n*eurotoxic *s*hellfish *p*oisoning).

*Brevetoxinele* sunt polieteri cu 10–11 inele condensate, cu gr. mol. circa 900 Da.

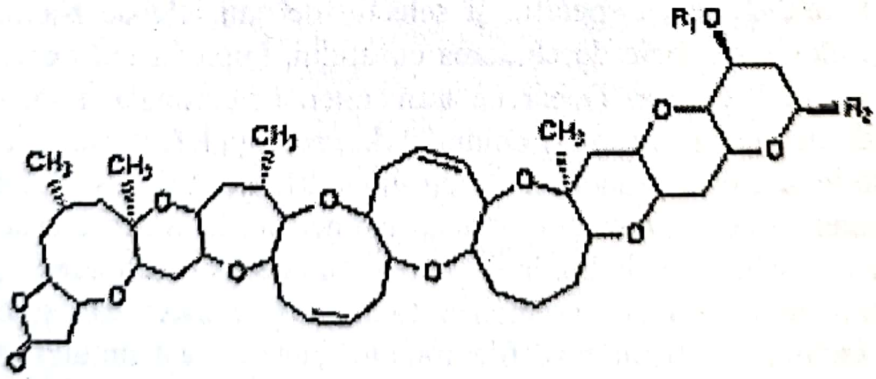
În funcţie de structura de bază se disting două clase de brevetoxine:

– de tip I, cu 11 inele, dintre care două heptamerice şi unul octameric);
– de tip II, cu 10 inele, cu variaţii dimensionale ale inelelor, de la 5 la 9 legături.

Cele mai abundente sunt cele de tip 1.



Brevetoxina –A (de tip I)



Brevetoxina-B (de tip II)

Brevetoxinele se leagă cu mare afinitate de canalele de Na, producând depolarizarea şi deschiderea lor, urmată de influxul necontrolat al Na în celulă. Rezultă activarea persistentă, adică deschiderea de lungă durată a canalelor de Na.

Scanned with OKEN Scanner

Spre deosebire de PSP, NSP nu este fatală şi simptomele (aceleaşi ca la PSP) dispar în câteva zile. Potenţialul toxic al brevetoxinelor se corelează cu afinitatea lor de legare de canalul de Na. Flexibilitatea structurii de bază condiţionează uşurinţa relativă cu care toxinele se pot intercala între domeniile transmembranare ale canalului de Na.

Brevetoxinele sunt foarte stabile în stare uscată şi în diferiţi solvenţi: acetonă, acetonitril, alcool, etil-acetat sau DMSO(dimetil-sulfoxid) şi în apă. Toxina este inactivată la pH mai mic de 2 sau mai mare de 10.

*Karenia brevis*, în mareea roşie, este frecvent asociată cu moarte piscicolă masivă, datorită toxinei eliberată prin liza celulelor care trec printre lamelele branhiilor. Intoxicaţia umană survine consumului de moluşte care au acumulat brevetoxine, prin reţinerea algelor din apa filtrată.

Brevetoxinele pot fi metabolizate de moluşte şi rezultă derivaţi noi. Omul se poate expune riscului intoxicaţiei prin inhalarea aerosolilor cu toxina eliberată ca urmare a spargerii celulelor sub acţiunea valurilor. Efectul este iritarea tractului respirator şi senzaţia de arsură.

Colorarea imuno-histochimică a ţesuturilor de *Trichecus manatus* (leul de mare) mort prin intoxicaţie, a relevat legarea brevetoxinei de limfocitele şi macrofagele din leziunile inflamatorii ale tractului respirator.

Brevetoxina este un inhibitor al unei clase de proteaze lizosomale – cistein-catepsina – importante pentru prelucrarea antigenelor. La om, brevetoxina acţionează ca factor imunosupresor, mai ales la cei cu expunere cronică la toxina din aerosoli.

*Toxina ciguatera** este o moleculă polieterică lipidică cu greutate mică, produsă de dinoflagelatul *Gambierdiscus toxicus*. Intoxicaţia apare în regiunile tropicale ale recifelor de corali, după consumul peştilor care au acumulat toxina în lanţul trofic. Peştii mari răpitori care consumă alga producătoare ce creşte ca epifit pe macroalgele filamentoase asociate cu recifele de corali sunt cea mai frecventă sursă de toxină ciguatera, dar şi peştii fitofagi, deoarece concentrează toxina în viscere.

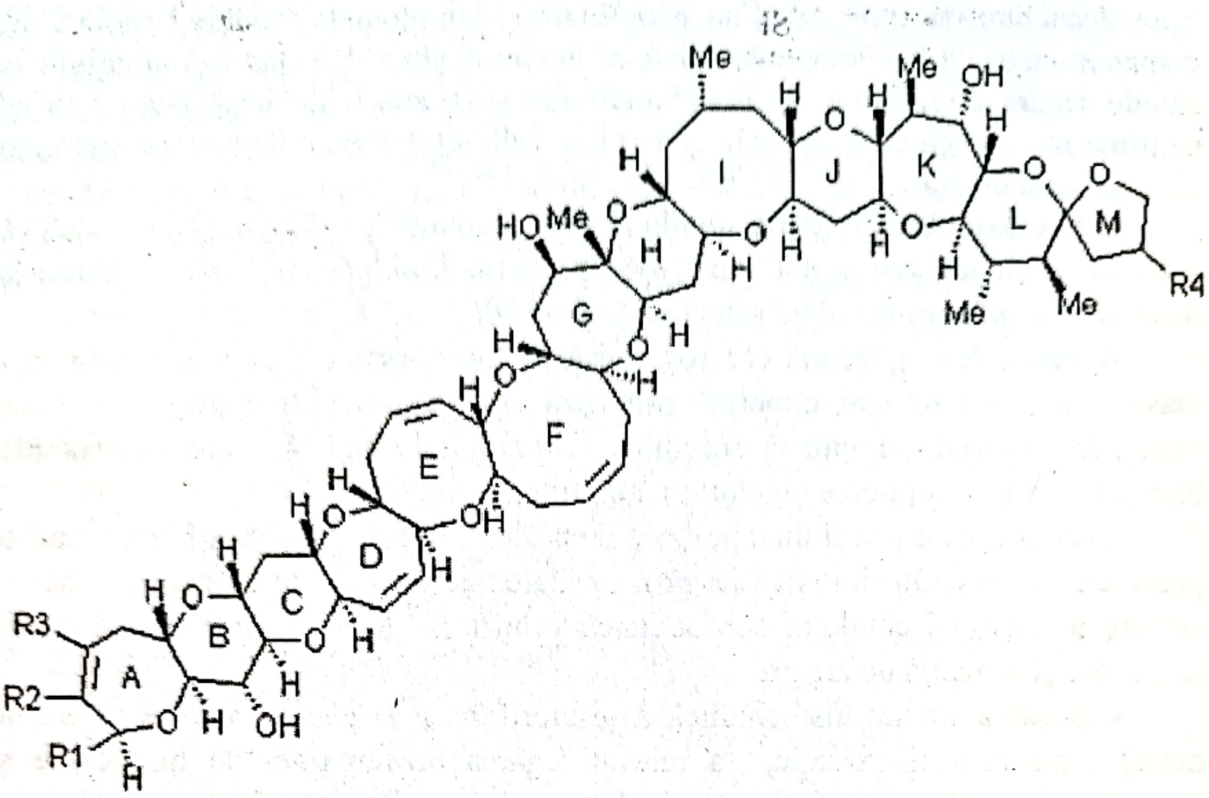
* Termenul *ciguatera* este originar în zona Caraibelor şi desemnează intoxicaţia produsă prin ingestia melcului marin *Turbo pica* (denumit *cigua*, cuvânt derivat de la *sigua – snail = melc*). Azi termenul desemnează o intoxicaţie cu peşte de recif din jurul insulelor Mării Caraibelor şi din Oceanul Pacific.

*Gambierdiscus toxicus* produce două clase de toxine polieterice: *ciguatoxine* şi *maitotoxine*.

*Ciguatoxinele* sunt o clasă de compuşi lipofili – polieteri lipidici cu greutate moleculară mică, ce se acumulează în ţesuturile peştilor fitofagi. Se cunosc 24 de ciguatoxine, distribuite în 3 grupe, dintre care câteva s-au caracterizat structural:

- toxinele de tip 1 au 60 de atomi de C în 13 cicluri fuzionate;
- toxinele de tip 2 au 57 atomi de C, în 13 inele fuzionate;
- toxinele de tip 3 prezintă ataşat la C 52, un ciclu eteric cu 6 atomi de C.

Scanned with OKEN Scanner




Ciguatoxina

Ciguatoxinele sunt înrudite structural cu brevetoxinele, intrând în competiţie cu ele pentru legarea cu mare afinitate de *canalul de Na* şi induc depolarizarea membranei, efectul fiind stimularea tranzitului ionilor de Na prin membranele celulelor musculare şi nervoase.

Ciguatoxina este considerată o *neurotoxină*, dar simptomele clinice sunt foarte variate: neurologice, cardiovasculare, gastrointestinale şi generale.

Simptomele apar în 10 minute până la 12 ore, dar pot apărea şi la 36 de ore după consumul peştelui intoxicat. Manifestările încep cu tulburări nervoase însoţite de manifestări vegetative: starea de rău general, vomă, diaree, alterarea stării generale, diminuarea senzaţiei de durere, senzaţii neobişnuite sau dureroase produse de stimuli obişnuiţi, inversarea senzaţiei termice (obiectele reci sunt resimţite calde şi invers). Tulburările gastrointestinale durează 1–2 zile, cele neurologice circa o săptămână, dar pot să reapară periodic timp de o lună sau mai mult. Dozele mari produc simptome care durează săptămâni, luni sau ani.

Ciguatoxina nu este inactivată prin prelucrarea termică a alimentelor.

Cel mai bun remediu al intoxicaţiei cu ciguatera în faza timpurie (1–3 zile după consumul peştelui toxic) a fost infuzia cu *manitol*. Manitolul nu este un antidot pentru toxină dar uşurează multe dintre simptomele severe ale intoxicaţiei la majoritatea victimelor.

Toxina produce simptome prelungite în timp, ceea ce indică existenţa leziunilor neuronale.

Scanned with OKEN Scanner

Căile neuronale activate de neurotoxinele marine (ciguatoxina, maitotoxina, brevetoxina, acidul domoic, acidul okadaic) au fost investigate la animalele de laborator. Două regiuni majore ale creierului sunt ţinta intoxicaţiei amnezice cu moluşte contaminate:

– hipocampul, ce controlează procesele de memorizare, suferă leziuni ireversibile;
– nucleul solitar din hipotalamus, ce reglează funcţia gastrointestinală;
– ciguatoxina activează regiunea preoptică mediană a hipotalamusului, ce controlează termoreglarea.

Recuperarea necesită regenerarea ţesutului nervos.

Concentraţiile de 1,0–0,1 ppb (părţi per bilion) de ciguatoxine sunt toxice pentru om. Toxicitatea lor este cu câteva ordine de mărime mai mare decât a brevetoxinelor, datorită afinităţii mai mari de legare.

*Maitotoxina* (MTX) cu diferitele variante moleculare, este una dintre cele mai puternice toxine marine care se găseşte în „mareea roşie" a dinoflagetelor.

Maitotoxinele au aceiaşi structură ca şi toxinele ciguatera (*polieteri lipidici*), dar sunt mai polare, datorită prezenţei grupelor sulfat multiple. Sunt sintetizate de *Gambierdiscus toxicus* şi s-au identificat ca toxine solubile în apă. Nu se concentrează în ţesuturile peştilor şi de aceea intoxicaţia este rezultatul consumului peştilor care se hrănesc cu alge. Activitatea biologică este dependentă de Ca, rezultând depolarizarea membranei şi influxul de Ca în celulă prin activarea canalelor specifice.

În toate sistemele celulare *in vitro* examinate, concentraţii subnanomolare produc creşterea intensă a concentraţiei $Ca^{2+}$ liber în citosol. Creşterea nu este rezultatul eliberării $Ca^{2+}$ din depozitele interne, ci mai curând din activarea canalului cationic permeabil pentru $Ca^{2+}$, exprimat ubicvitar, neselectiv, din membrană. Activarea canalului este urmată, după o scurtă perioadă de lag, de activarea sau formarea unor pori endogeni mari, care permit moleculelor organice cu greutate moleculară mai mare de 800 Da, să treacă prin membrana plasmatică. Activarea acestor pori poate fi determinată experimental, urmărind înglobarea coloranţilor vitali cu etidiu şi propidiu. Aceşti coloranţi cu gr. mol. diferite sunt în mod normal excluşi din citoplasma celulelor viabile intacte, dar dobândesc acces în interiorul celulei după formarea porilor, unde se leagă de acizii nucleici, cu creşterea concomitentă a fluorescenţei. Porii mari activaţi de maitotoxină s-au denumit pori citolitici/oncotici, deoarece activarea lor are ca rezultat final eliberarea LDH (lactic-dehidrogenazei), un indicator al morţii celulare necrotice sau oncotice*.

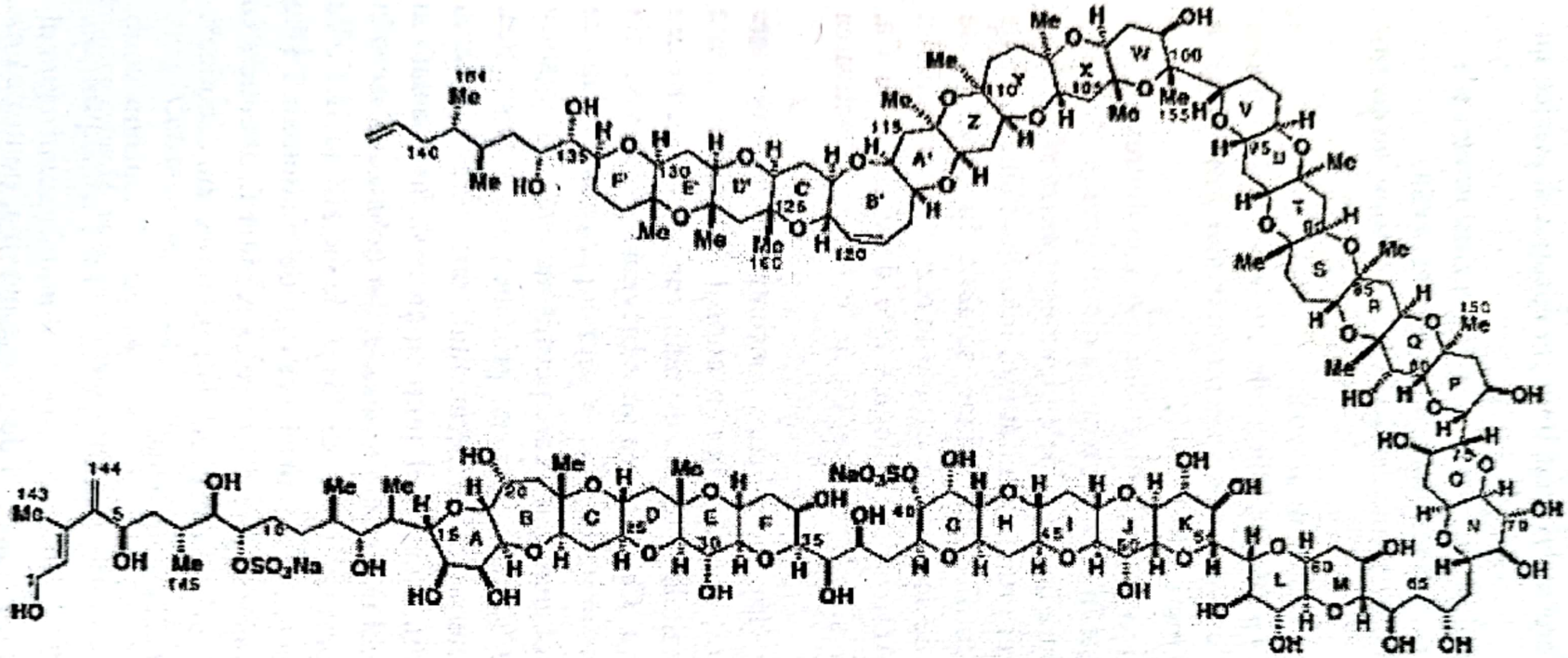
Maitotoxina este mai toxică decât ciguatoxina.

* Presiunea oncotică este presiunea exercitată de coloizii dintr-o suspensie. Moartea oncotică survine ca urmare a pierderii coloizilor intracelulari.

De obicei, MTX este mai puţin importantă decât ciguatoxina, pentru că este mai puţin frecventă în ţesuturile peştilor.

Scanned with OKEN Scanner

a)



b)

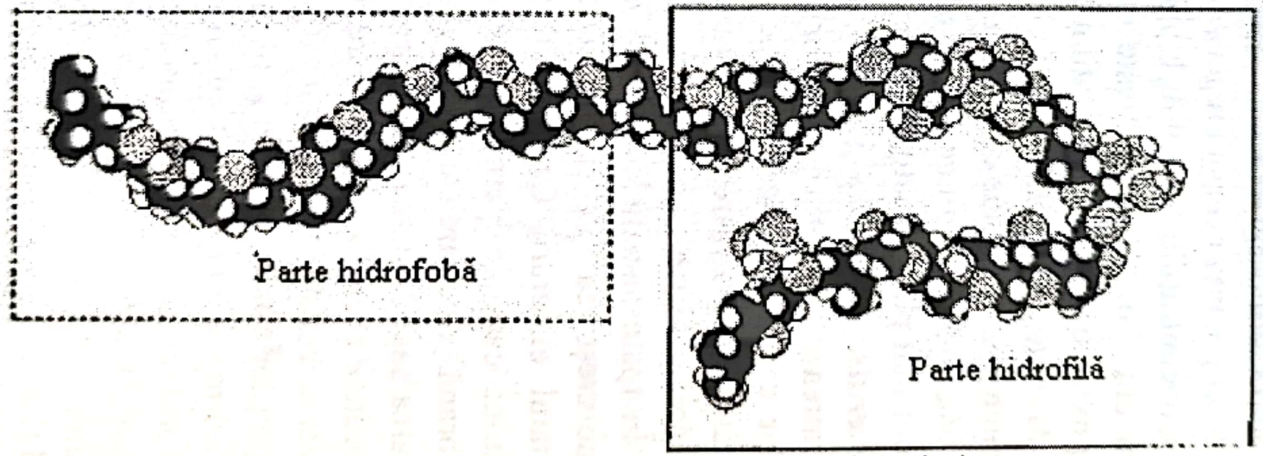



Fig. 44 – a) Structura moleculară a maitotoxinei,
b) Reprezentarea schematică a structurii tridimensionale a moleculei de maitotoxină. Molecula are un domeniu hidrofob şi unul hidrofil.

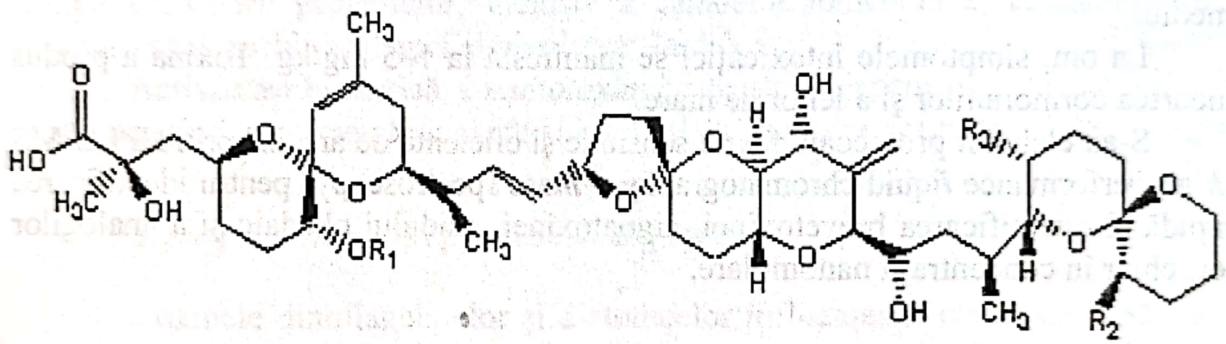
Scanned with OKEN Scanner

*Acidul okadaic* şi derivaţii săi formează o clasă de toxine polieterice acide liposolubile, sintetizate de dinoflagelate, care produc intoxicaţia diareică datorată consumului moluştelor contaminate (DSP). Iniţial s-a izolat de la spongierul *Halichondria okadai*. Sunt compuşi solubili în solvenţii organici, instabili în mediul acid sau alcalin.

Acidul okadaic şi toxinele diareice sunt produse de *Prorocentrum hoffmanianum, Prorocentrum lima, Prorocentrum elegans, Prorocentrum concavum, Dinophysis.* Acţiunea lor constă în inhibiţia fosfatazelor serină/treonină, deoarece se leagă specific de aceste molecule.

Acidul okadaic este un *inhibitor al fosfatazelor serină/treonină*, enzime care defosforilează resturile de Ser şi Thr ale unor enzime, comutându-le la starea activă sau inactivă.

Efectele toxice se manifestă faţă de celulele eucariote şi nu influenţează procariotele sau plastidele celulelor eucariote. $DL_{50}$ este de 210 µg/kg, după injecţia intraperitoneală la şoarece.




Acidul okadaic

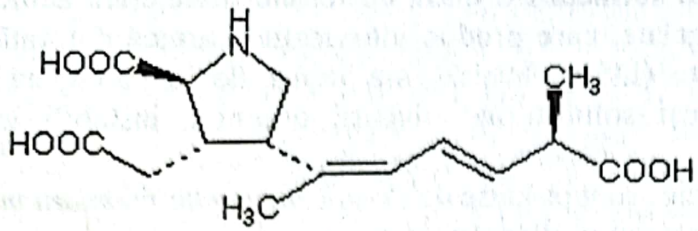
Efectele diareice induse de DSP se datorează, probabil, fosforilării excesive a proteinelor cu rol de canale ionice în celulele epiteliului intestinal. Toxina este un ionofor de $Ca^{2+}$. Rezultatul intoxicaţiei este dezechilibrul apei celulare şi pierderea ei.

Toxinele polieterice din această clasă sunt *promotori tumorali*. Acidul okadaic produce fibropapiloame la broasca ţestoasă de mare *Eretmochelys imbricata.* Tumorile sunt mase fibroase de ţesut care cresc pe ochi, cavitatea bucală, membre şi chiar în plămâni şi rinichi.

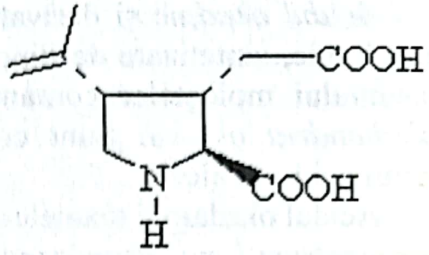
*Acidul domoic* ($C_{15}H_{21}N_1O_6$) sintetizat de *Pseudonitzschia* şi de alga roşie *Chondra armata* (cunoscută în limba japoneză sub denumirea „domoi") *(Rhodomelaceae)* este agentul *intoxicaţiei amnezice* cu moluşte (ASP). Este singura intoxicaţie cu moluşte (midii) produsă de diatomee. Acidul domoic este un *aminoacid tricarboxilic* solubil în apă, care acţionează ca analog al unui mediator sinaptic – *glutamatul* – fiind un receptor agonist al acestuia. Este analogul structural al acidului kainic*: ambele molecule derivă din prolină.

* Acidul kainic a fost izolat dintr-o algă marină roşie. Este un stimulator puternic al SNC şi acţionează prin intermediul unui receptor specific.

Scanned with OKEN Scanner




Acidul domoic




Acidul kainic

Acidul domoic se leagă cu afinitate mare de receptorii pentru *glutamat* şi determină creşterea nivelului $Ca^{2+}$ intracelular, prin interacţiuni cooperante cu canalele de Ca. Este un excitator sinaptic. În creier, leziunile apar în zonele de mare densitate a sinapselor glutaminergice (hipocamp).

S-au evidenţiat 7 membri ai familiei acestei toxine. Sinteza acidului domoic este stimulată cu stresul fiziologic: limitarea Si şi P sau excesul de azot combinat. *In vitro*, acidul domoic se sintetizează în faza staţionară, o dată cu epuizarea Si din mediu.

La om, simptomele intoxicaţiei se manifestă la 1–5 mg/kg. Toxina a produs moartea cormoranilor şi a leilor de mare.

S-au elaborat protocoale foarte sensibile şi eficiente de analiză prin HPLC-MS (***h**igh **p**erformance **l**iquid **c**hromatography – **m**ass **s**pectroscopy*) pentru identificarea rapidă şi quantificarea brevetoxinei, ciguatoxinei, acidului okadaic şi a analogilor lor, chiar în concentraţii nanomolare.

### *Mecanismele acţiunii toxinelor algale*

Deşi analogii PST au toxicităţi diferite, mecanismul de acţiune este acelaşi: interacţiunea foarte specifică cu canalele ionce implicate în transmiterea potenţialului de acţiune. Rezultatul este blocarea canalelor de sodiu în celulele nervoase de mamifere, împiedicând astfel conducerea semnalelor. Consecinţa este paralizia musculară a mamiferelor şi posibil moartea, care survine prin insuficienţă respiratorie.

Sunt două tipuri de toxine algale:

- *toxine cu acţiune moderată*, rareori fatală, dar care pot produce leziuni hepatice cronice (hepatotoxine);
- *toxine cu acţiune puternică*, de tip alcaloid, de obicei fatale în timp scurt (neurotoxine).

Hepatotoxinele îşi exercită acţiunea la nivelul ficatului şi produc dureri abdominale, tulburări gastrointestinale, vomă şi pot produce moartea în 36 de ore. Intoxicaţia gravă la om şi animale poate să producă icter, cu îngălbenirea mucoaselor. Pot să producă neoplazii hepatice.

Neurotoxinele afectează sistemul nervos şi respirator. Ele produc starea de confuzie, paralizia rapidă, insuficienţa respiratorie şi chiar moartea în 30 de minute.

Scanned with OKEN Scanner

Nu există nici un antidot cunoscut eficient care să contracareze efectele toxinelor ingerate.

Incidenţa intoxicării umane cu PST a crescut după 1970, ajungând la circa 2000 de cazuri raportate anual/glob, cu o rată a mortalităţii de 10–20%.

Neurotoxicitatea toxinelor *PSP* este mediată de interacţiuni cu grad înalt de specificitate, cu *canalele ionice* implicate în transmiterea impulsului nervos. Moluştele filtrante, zooplanctonul şi peştii fitofagi au rolul unor vectori direcţi, deoarece transferă toxina concentrată, la nivele trofice superioare.

*Acidul okadaic* produs de dinoflagelate şi cianobacterii inhibă o ţintă comună: proteinele cu acţiune fosfatazică serină/treonină. Acidul okadaic se leagă pe subunitatea catalitică a fosfatazei, la situsul activ al enzimei. Fosfatazele serină/treonină sunt componente esenţiale ale cascadei de semnalizare a celulei eucariote. Ele reglează procese metabolice, echilibrul ionic, transmiterea nervoasă, ciclul celular etc.

Diareea asociată toxinelor algale pare să survină ca rezultat al hiperfosforilării proteinelor, inclusiv a canalelor ionice în epiteliile intestinale, rezultând dezechilibrul apei şi pierderea fluidelor.

Activitatea biologică a *maitotoxinei* este strict dependentă de Ca şi produce atât depolarizarea membranei cât şi influxul Ca în multe tipuri de celule.

### *Tipuri de intoxicaţii produse de algatoxine*

Toxinele dinoflagelatelor şi diatomeelor influenţează starea de sănătate prin consumul alimentelor marine. Moluştele care filtrează apa, zooplanctonul şi peştii fitofagi au rol de vectori, fie direct, fie prin transferul toxinei în lanţul trofic. Toxinele algale produc următoarele categorii de simptome toxice:

- amnezia consecutivă intoxicaţiei cu moluşte (amnesic shellfish poisoning - ASP);
- intoxicaţia ciguatera produsă prin consumul de peşte (ciguatera fish poisoning - CFP);
- intoxicaţia diareică cu moluşte (diarrhetic shellfish poisoning - DSP);
- intoxicaţia neurotoxică cu moluşte (neurotoxic shellfish poisoning - NSP);
- intoxicaţia paralitică cu moluşte (paralytic shellfish poisoning - PSP).

***ASP*** (*a*mnesic *s*hellfish *p*oisoning = intoxicaţia amnezică cu moluşte) este produsă de diatomeea *Pseudonitzschia*, care sintetizează *acidul domoic*. Moluştele bivalve şi unii peşti filtrează diatomeele din apă. În majoritatea cazurilor, acidul domoic se acumulează în viscerele acestor organisme. ASP poate fi un sindrom ce periclitează viaţa, caracterizat prin tulburări gastrointestinale şi neurologice. Gastroenterita apare în 24 de ore după consumul moluştelor toxice şi include starea de rău general, vomă, crampe abdominale şi diaree. În cazurile severe pot să apară simptome neurologice în decurs de 48 de ore de la consumul moluştelor toxice: dureri de cap, atac cerebral, pierderi temporare de memorie, dificultăţi respiratorii, comă.

Scanned with OKEN Scanner

Acidul domoic este o neurotoxină ce interferă cu transmiterea sinaptică a impulsurilor nervoase. Este un antagonist al glutamatului.

***CFP*** (***c***iguatera ***f***ish ***p***oisoning = intoxicaţia ciguatera datorată consumului de peşte) este produsă de ingestia *ciguatoxinei* şi *maitotoxinei* sintetizate de *Prorocentrum concavum, Prorocentrum lima, Gambierdiscus toxicus.*

Intoxicaţia ciguatera la om şi animalele domestice este cauzată de neurotoxinele produse de dinoflageletale bentice, care trăiesc pe recifele de corali. Algele sunt consumate de peştii fitofagi. CFP se manifestă la om după consumul de peşte intoxicat cu alge. Sunt cel puţin 4 toxine care se concentrează în viscerele peştilor. Simptomele iniţiale sunt gastrointestinale: diaree, dureri abdominale, starea de rău general, vomă. Ulterior apar simptome neurologice (parestezia membrelor, vertigo, alterarea percepţiei cald-rece, dureri musculare pierderea coordonării motorii, prurit, anxietate) şi cardiovasculare (scăderea ritmului cardiac şi hipotensiune). În cazurile grave, moartea poate să survină prin insuficienţă respiratorie.

Tratamentul rapid, în primele 24 de ore, atenuează simptomele. Abstinenţa completă de a consuma peşti tropicali de recif previne intoxicarea.

***DSP*** (***d***iarreic ***s***hellfish ***p***oisoning) se datorează consumului moluştelor care au concentrat *acidul okadaic*, o toxină produsă de *Dinophysis* şi *Prorocentrum lima*. Intoxicaţia produce simptome gastrointestinale într-un interval de 30 minute – câteva ore după consumul moluştelor toxice. Simptomele sunt localizate şi constau în tulburări gastrointestinale datorate leziunilor epiteliale. Recuperarea are loc în 3 zile, cu sau fără tratament medical.

În afara efectului acut, expunerea cronică poate favoriza transformarea malignă. Toxina creşte incidenţa tumorilor tegumentare la şoarece dacă se aplică după un carcinogen.

Acidul okadaic este localizat în cloroplaste. La *Prorocentrum lima*, toxina intracelulară se găseşte sub forma unui precursor inactiv al acidului okadaic, care este eliberat din celulă şi este redus la diol-ester. Acesta poate fi clivat la legătura esterică şi rezultă toxina activă – acidul okadaic.

***NSP*** (***n***eurotoxic ***s***hellfish ***p***oisoning) este mediată de *brevetoxinele* sintetizate de *Gymnodinium breve*. Este o intoxicaţie aproape identică cu cea produsă de ciguatera. Predomină simptomele neurologice şi gastrointestinale: pierderea sensibilităţii (parestezie), tulburări diareice, vomă, transpiraţie.

Brevetoxinele sunt neurotoxine neletale, deşi toxina este mortală după administrare experimentală pe diferite căi, inclusiv cea orală. NSP nu produce efecte letale şi simptomele dispar în câteva zile. Nu există antidot pentru NSP.

***PSP*** (***p***aralytic ***s***hellfish ***p***oisoning = intoxicaţia paralizantă cu moluşte) este consecinţa consumului moluştelor bivalve care se hrănesc prin filtrarea dinoflagelatelor din apă (*Alexandrium, Gymnodinium, Pirodinium, Protogonyaulax*), ce produc o clasă de molecule toxice denumite *saxitoxine*, care se acumulează în viscerele moluştelor.

Scanned with OKEN Scanner

*Saxitoxinele* (STX) sunt alcaloizi neurotoxici, cunoscute ca toxine paralizante, asociate cu moluştele marine. Denumirea derivă de la *Saxidomus giganteus*, reprezentantul moluştelor în care s-au identificat. Sinteza acestor toxine are loc în special în timpul înfloririlor algale cu *Protogonyaulax, Alexandrium catenella, Alexandrium minutum, Alexandrium ostenfeldii, Alexandrium tamarense, Gymnodinium catenatum*. Toate produc saxitoxine ce pot fi bioconcentrate de moluştele care se hrănesc cu microalgele prin filtrarea apei. Deşi midiile nu sunt influenţate de saxitoxine, prădătorii midiilor fac rapid simptomele intoxicaţiei.

Intoxicaţia paralizantă cu moluşte este periculoasă pentru om şi pentru animalele marine. Frecvenţa mareelor roşii şi a intoxicaţiei paralizante a crescut odată cu progresul civilizaţiei, datorită creşterii cantităţii de nutrienţi deversaţi în ocean, favorizanţi ai înfloririlor cu dinoflagelate.

Toxina blochează transmiterea neuronală prin legarea de canalele de Na dependente de potenţialul electric. Canalul de Na este închis şi tranzitul transmembranar al ionilor de Na este blocat. Astfel, este blocată propagarea potenţialelor de acţiune.

Saxitoxina acţionează asemănător cu toxina botulinică, deoarece inhibă eliberarea acetilcolinei la nivelul sinapselor în sistemul nervos periferic. Saxitoxina este de circa 1000 de ori mai toxică decât gazul sarin. Doza mortală pentru cobai este de 5 µg/kg după injectare intramusculară. Doza letală pentru om este de circa 5,7 µg/kg, adică 0,5 mg de saxitoxină este letală după ingestie, iar doza letală injectată este de 10 ori mai mică. Moartea survine prin insuficienţa respiratorie, datorată paraliziei muşchiului diafragmei.

Simptomele neurologice se instalează rapid, între 10 minute şi 4 ore după ingestie, în funcţie de doză. Efectele toxice consecutive inhalării toxinei din aerosoli sunt puternice şi rapide, iar injectarea toxinei produce moartea în 15 minute. Dacă victima supravieţuieşte 12 ore, şansele de recuperare cresc, pentru că toxina este eliminată din organism. Nu există terapie specifică, ci numai tratament simptomatic. Identificarea saxitoxinei drept cauză a intoxicaţiei este importantă, deoarece administrarea atropinei creşte rata mortalităţii.

Incidenţa intoxicaţiei paralitice cu moluşte a crescut în ultimele decenii, odată cu creşterea gradului de poluare a apelor oceanice cu nutrienţi care produc eutrofizarea şi dezvoltarea excesivă a fitoplanctonului.

Toxinele algale se concentrează în lanţul trofic marin: în ţesuturile balenelor, delfinilor, ale altor mamifere marine mari, ale păsărilor, în peşti şi moluşte şi produc îmbolnăviri la om. Midiile produc cele mai grave intoxicaţii, deoarece sunt consumate integral şi toxina se concentrează în viscere.

Tulburările digestive pot să însoţească tabloul. În cazurile neletale, dispar după câteva zile. În cazurile grave produc moartea prin insuficienţă cardio-respiratorie, după paralizia muşchiului diafragm.

Inhalarea produce un atac mai rapid, iar injectarea poate produce moartea în 15 minute.

Scanned with OKEN Scanner

Saxitoxinele au potenţial toxic militar, pentru că sunt extrem de toxice, se pot obţine pe scară mare prin extracţie din culturile speciilor producătoare, sunt relativ persistente şi sunt greu de identificat.

Algatoxinele produc *leziuni tegumentare*, similare stărilor de hipersensibilite de contact.

*Prototheca* este singura algă care produce o stare patologică infecţioasă, dar numai sub forma unei infecţii secundare. A fost considerată ca aparţinând fungilor, deoarece este incoloră, nu conţine clorofilă, dar recent s-a demonstrat că este o varietate a algei *Chlorella*, ce s-a adaptat la nutriţie heterotrofă, prin pierderea cloroplastului. *Protoţheca* se poate izola din apă, din apă de canal şi din tractul gastrointestinal. Infecţia apare numai în stările de deficienţă a funcţiei imunitare. La om produce leziuni tegumentare şi bursita (inflamaţia cavităţilor articulare).

Persoanele care lucrează fără protecţie cu pământul de diatomee, fac *silicoză*, datorată prafului inhalat ce conţine o mare cantitate de siliciu. Hiperplazia guşogenă a glandei tiroide este frecvent rezultatul ingestiei unor cantităţi mari de alge bogate în iod.

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul V*

# TOXINE ŞI SUBSTANŢE POTENŢIAL TOXICE PRODUSE DE PLANTE

Unele plante sintetizează substanţe care au potenţial toxic înalt şi fac parte din categoria toxinelor propriu-zise, sau substanţe potenţial toxice care produc efecte toxice numai prin supradozare. Substanţele toxice sau potenţial toxice pătrund în organism prin absorbţie tegumentară, pe cale digestivă sau respiratorie.

O plantă este considerată toxică, dacă prin atingere, prin consum sau prin prin inhalare produce efecte defavorabile asupra organismului. Substanţele toxice ale plantelor se clasifică în funcţie de efectele asupra organismului animal sau uman sau în funcţie de structura chimică. Se disting următoarele clase de compuşi chimici cu efecte toxice:

- *aminoacizi*. Plantele sintetizează cei 20 de aminoacizi esenţiali, care intră în structura proteinelor şi susţin funcţiile specifice ale celulei, atât interne cât şi externe, dar şi un număr mare de *aminoacizi neproteici*, care uneori produc *efecte toxice* asupra organismului uman. Unii aminoacizii au proprietăţi farmacologice: *L-cisteina* se găseşte în ţesuturile tuturor plantelor şi se administrează ca picături pentru tratarea unor afecţiuni oculare; *L-arginina* stimulează eliberarea hormonului de creştere din hipofiză, iar acidul aspartic se găseşte în cafea, în sfecla de zahăr, în trestia de zahăr şi este neuroexcitator;
- unele *proteine* ale plantelor sunt componente ale dietei zilnice, iar altele sunt toxice: *ricina* şi *abrina* au potenţial toxic foarte înalt şi fac parte din categoria toxinelor propriu-zise, iar unele lectine (glicoproteine) au de asemenea potenţial toxic;
- *alcaloizi* – compuşi chimici alcalini azotaţi produşi de un număr mare de plante. Sunt derivaţi din aminoacizi şi au acţiune asupra SNC. Unii alcaloizi sunt utilizaţi pentru producerea unor medicamente, iar alţii au efecte letale;
- *glicozide* – substanţe toxice în care cel puţin o moleculă glucidică este legată cu oxigenul altui compus, adeseori o bază azotată. Glicozidele devin nocive după ce molecula glucidică este disociată pe cale enzimatică, în tubul digestiv, de baza azotată. Se găsesc în *Digitalis*, leguminoase, *Euphorbiaceae, Aloe, Daphne* etc.;
- *oxalaţi* – săruri instabile, foarte toxice, ale acidului oxalic. În tubul digestiv, sărurile se disociază şi eliberează *acidul oxalic*, cu efecte toxice. *Arum maculatum* (rodul pământului), *Diffenbachia* şi *Philodendron* conţin cristale de oxalat;

Scanned with OKEN Scanner

– *fenoli* – compuşi acizi care se leagă cu proteinele celulare şi le denaturează. Toxina fenolică este iritantă după contactul tegumentar şi se găseşte în oţetarul veninos (*Rhus*), în stejarul veninos (*Toxicodendron*), dar şi în urzică (*Urtica dioica*);

– *răşini şi uleiuri volatile* – derivaţi ai hidrocarburilor, fiind alcătuite din C, H şi O. Acest grup de toxine este diversificat şi se găseşte la *Daphne mezereum, Rhododendron* şi la *Euphorbiaceae*;

– *fototoxine* – substanţe chimice care acţionează ca sensibilizatori ai tegumentului la radiaţiile solare UV şi la alte surse de lumină;

– *substanţe cancerigene şi cocancerigene*. O plantă este considerată cancerigenă dacă determină creşterea incidenţei neoplaziilor la animalele sau la indivizii umani care o consumă sau care vin în contact cu ea. *Pterium aquilinum* (feriga de câmp) şi *Senecio jacobaea* sunt plante care sintetizează substanţe cu efecte cancerigene.

O plantă este cocancerigenă dacă substanţa produsă determină apariţia neoplaziilor în asociaţie cu o altă substanţă cancerigenă. Substanţele din plante ar avea în acest caz rolul de promotori.

În funcţie de simptomele dominante pe care le produc, se disting mai multe categorii de plante toxice:

– *plante toxice care perturbă activitatea muşchiului cardiac*:

*Aconitus napellus* produce glicozidul *aconitina*; rădăcinile sunt cele mai toxice; tulbură ritmul cardiac;

*Digitalis purpurea* produce glicozidul *digitoxina*: efectul caracteristic este bradicardia;

*Veratrum album* produce o substanţă toxică din familia alcaloizilor: bradicardie, tulburări ale tensiunii arteriale, tulburări ale conducerii potenţialelor şi ale ritmului cardiac;

*Viscum album* determină bradicardie, hipotensiune, fibrilaţie ventriculară;

*Taxus baccata* produce *taxina*; tulburări de ritm, hipotensiune colaps vasomotor;

*Nerium oleander* produce un *heterozid*: efectul este tahicardia, urmată la scurt timp de bradicardie, tulburări ale conducerii potenţialelor şi de ritm cardiac;

– *plante care produc substanţe halucinogene*:

*Atropa belladona, Hyosciamus niger* şi *Datura* produc atropina, scopolamina hiosciamina: delir, halucinaţii, convulsii, paralizie moarte;

*Mandragora officinarum* produce scopolamina, hiosciamina: agitaţie motorie, confuzie mentală, delir halucinaţii;

*Brugmansia* sp. produce atropina, scopolamina, hiosciamina: halucinaţii, paralizie;

– *plante cianogene*, ale căror efecte toxice sunt consecutive ingestiei:

*Manihot esculenta* (manioc) produce glucozide cianogene, ale căror efecte sunt depresia respiratorie, convulsiile, coma, decesul. Frunzele şi rădăcinile se consumă după detoxifiere prin preparare;

Scanned with OKEN Scanner

– *plante ai căror compuşi acţionează asupra sistemului nervos*:

*Cicuta*: toate organele plantei sunt toxice, dar rădăcina are cel mai mare grad de toxicitate. Substanţele toxice sunt derivaţi acetilenici: produc convulsii, aritmie cardiacă, tulburări respiratorii, insuficienţă renală;

*Solanum americanum*; toate organele plantei, dar în special frunzele tinere, conţin *solanina*: produc depresie respiratorie, convulsii, comă.

*Phytolaca americana*; substanţele toxice se găsesc în frunze şi în rădăcini: produc vertij, diminuarea forţei musculare, tulburări vizuale, tulburări ale conducerii potenţialelor în muşchiul cardiac, stare de prostraţie, colaps.

*Coriaria myrtifolia*; toate ţesuturile plantei conţin taninuri toxice: produce convulsii, comă, deces;

– *plante care produc substanţe cu acţiune toxică preponderent digestivă*:

*Cytisus laburnum*; seminţele conţin *citisina*: produce tulburări digestive

*Spartium junceum*; toate organele plantei conţin *alcaloizi* care produc tulburări digestive;

*Abrus precatorius*; baca este toxică: produce gastroenterită severă, deshidratare, colaps, tulburări neurologice (midriază, confuzie, halucinaţii, convulsii);

*Ricinus communis*; toate organele plantei, dar în special seminţele conţin *ricina*, o toxină proteică foarte puternică: tulburări digestive severe (vomă, diaree, deshidatare, colaps vasomotor), neurologice, aritmie cardiacă, hipoglicemie, hemoliză;

– *plante toxice care produc tulburări digestive şi dermatită de contact*:

*Euphorbia pulcherrina* conţine toxine terpenice, care prin ingestie produc senzaţia intensă de arsură a cavităţii bucale, edem bucal şi faringian, disfagie, tulburări digestive, iar contactul tegumentar produce dermatită;

– *plante care conţin toxine iritante pentru tegument*: produc reacţia cutanată imediată de tipul arsurii;

– *intoxicaţii prin consumul abuziv al tonicelor sau prin stupefiante:*

*Kola* este folosită contra asteniei: excesul produce tulburări digestive, nervozitate, tulburări de ritm cardiac;

*Erytroxylon coca*: frunzele se folosesc pentru combaterea stării de oboseală şi a senzaţiei de foame; produce stare euforică, stimularea funcţiilor intelectuale, hiperactivitate, tulburări ale ritmului cardiac;

*Marijuana* din *Canabis sativa*: fumul frunzelor produce o stare euforică. Excesul determină o stare de angoasă şi de confuzie mentală.

### Alcaloizii

*Alcaloizii* formează un grup mare de compuşi chimici ai plantelor. Sunt metaboliţi secundari cu structură heterociclică, derivaţi din aminoacizi, ce includ un număr foarte mare de compuşi azotaţi. Denumirea de *alcaloizi* reflectă caracterul bazic al acestor substanţe.

Scanned with OKEN Scanner

Alcaloizii formează un grup de substanţe heterogene din punct de vedere structural: conţin unul sau mai multe inele de C, de obicei cu un atom de N în ciclu. Poziţia atomului de N în inel variază la diferiţi alcaloizi şi la diferite familii de plante. La unii alcaloizi, de exemplu *mescalina* şi *efedrina*, atomul de N nu se găseşte în interiorul inelului de C. Atomul de N influenţează proprietăţile acestor compuşi. Unii alcaloizi au asemănări structurale cu neurotransmiţătorii din SNC uman: dopamina, serotonina şi acetilcolina.

Acţiunea stimulatoare sau toxică a unor produse vegetale (opiu, coaja arborelui de chinină, curara) folosite de milenii, se datorează alcaloizilor.

Se cunosc peste 10 000 de compuşi din clasa alcaloizilor, din peste 300 de familii de plante, dar în special în reprezentanţii familiilor *Fabaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae* şi *Berberidaceae*. Genurile de plante care au cel mai înalt conţinut de alcaloizi sunt *Nicotiana, Vinca, Strychnos, Papaver somnifera* şi *Rauwolfia serpentina*.

Majoritatea sunt substanţe solide, adeseori formând cristale caracteristice (nicotina, coniina). Cel puţin într-un anumit stadiu de dezvoltare, alcaloizii se găsesc în toate organele plantei.

Alcaloizii sunt puţin solubili în apă şi sunt uşor absorbiţi prin tegument şi prin membranele mucoase, dar se dizolvă în solvenţi organici: benzen, cloroform, etanol, alcool amilic, eter etilic, acetonă etc. Au caracter bazic, unii foarte slab, alţii foarte pronunţat. Datorită acestui fapt dau săruri în reacţiile cu acizii. Sărurile sunt solubile în apă şi în etanol, dar greu solubile în solvenţii organici. Din soluţiile sărurilor, prin alcalinizare se eliberează bazele. Prin oxidare (cu acid azotic, permanganat de potasiu, tetraacetat de Pb), molecula complexă a alcaloizilor se descompune în componente mai simple.

Cele mai multe plante producătoare de alcaloizi sunt dicotiledonate. Mai rare sunt monocotiledonatele şi criptogamele. De obicei, un alcaloid este produs de o singură specie sau de câteva foarte înrudite. De cele mai multe ori, o plantă conţine un amestec de alcaloizi cu structuri chimice asemănătoare. Uneori sunt atât de caracteristici încât sunt consideraţi markeri moleculari pentru studiile de sistematică.

În ţesuturile plantelor, în mod obişnuit, alcaloizii se găsesc ca familii de compuşi înrudiţi structural. Uneori coexistă tipuri structurale diferite de alcaloizi. La *Erythroxylum coca* se găsesc alcaloizi cu nucleu pirolidinic şi cu nucleu tropanic. Coaja arborelui de chinină conţine peste 20 de alcaloizi. Conţinutul plantelor în alcaloizi variază odată cu condiţiile de sol, climă şi chiar cu anotimpul. Unele plante tropicale îşi pierd capacitatea de a produce alcaloizi după ce sunt aclimatizate în regiunile temperate. Multe plante nu conţin alcaloizi, ceea ce sugerează că aceşti compuşi nu îndeplinesc funcţii fiziologice importante.

Alcaloizii se sintetizează din aminoacizi sau din produşii de degradare ai acestora: amine, aldehide, provenite din decarboxilarea oxidativă.

Din punct de vedere fiziologic, rolul alcaloizilor nu este cunoscut: ar putea avea rol de apărare faţă de animalele ierbivore sau ar fi produşi rezultaţi din

Scanned with OKEN Scanner

catabolismul proteinelor, pe care planta îi depozitează în ţesuturile sale. Această ipoteză este puţin verosimilă, deoarece unii alcaloizi sunt molecule cu o structură complexă care conţin un singur atom de N. Alcaloizii se sintetizează din aminoacizi sau din produşi de catabolism ai acestora: amine, aldehide rezultate din decarboxilarea oxidativă a aminoacizilor. Alcaloizii au o acţiune activatoare sau inhibitoare asupra unor procese enzimatice: de exemplu, nicotina inhibă efectul Pasteur*.

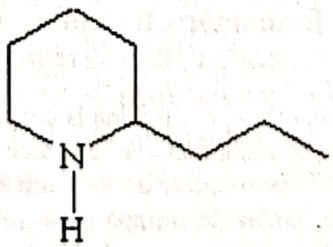
* O celulă facultativ-anaerobă metabolizează glucoza pe cale aerobă sau fermentativă. Pe cale fermentativă, glucoza este degradată la lactat, rata degradării fiind mult mai mare decât în condiţii aerobe. Diferenţa se datorează randamentului mai mic de sinteză a ATP/moleculă, în timpul glicolizei: pe cale fermentativă se produc 2 molecule de ATP/moleculă, iar în aerobioză se sintetizează 36 molecule de ATP. În anaerobioză, pentru sinteza aceleiaşi mase celulare este necesară de 18 ori mai multă glucoză.

Dacă suspensia celulară anaerobă se oxigenează, rata de consum a glucozei scade foarte mult, iar acumularea lactatului scade până spre zero. Fenomenul inhibării consumului de glucoză şi stoparea acumulării lactatului în prezenţa $O_2$ se numeşte *efect Pasteur*. Efectul s-a descoperit pentru fermentaţia alcoolică, dar este o caracteristică a tuturor celulelor facultative, inclusiv a celulelor musculare.

Cel mai adesea, alcaloizii se găsesc în frunze, seminţe, rădăcini sau în scoarţa plantei, ca săruri ale acizilor: citric, lactic, acetic, malic, tartric, oxalic sau ale acizilor foarte specifici (acidul *fumaric* la *Fumaria officinalis,* acidul *aconitic* la *Aconitum*, acidul *chelidonic* la *Chelidonium majus* şi la *Veratrum album*, acidul *meconic* în opiu la *Papaver somniferum*, acidul *chinic* în coaja arborelui de chinină).

Alcaloizii sunt cei mai potenţi compuşi terapeutici şi au stat la baza producerii unui număr mare de medicamente alopatice, inclusiv morfina ca analgezic şi chinina ca antimalaric.

*Alcaloizi cu nucleu piperidinic sau piridinic*. Singurul inel de C conţine un atom de N. Alcaloizii din *Conium maculatum* (cucută) se găsesc sub forma sărurilor acidului malic şi acidului cafeic. *Coniina* se sintetizează din acidul octanoic şi este o otravă puternică: produce paralizia nervilor motori, iar în doze mari produce moartea prin paralizia centrilor respiratori.



Coniina

Toate părţile plantei conţin un suc galben şi uleios, dar fructele şi frunzele sunt deosebit de toxice*. Alcaloidul, produce iniţial o stimulare a sistemului nervos,

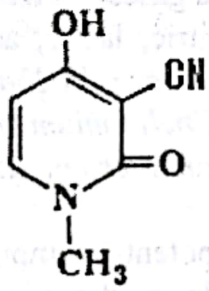
Scanned with OKEN Scanner

ca şi nicotina, dar ulterior efectul este profund depresiv. Stimularea iniţială este de scurtă durată, urmată fiind de o depresie severă a SNC, de paralizie şi moarte.

Planta ingerată este toxică atât pentru om cât şi pentru animale. Coniina produce efecte teratogene. Cele mai toxice sunt florile. Componenta toxică este *γ-coniceina*, de 7–8 ori mai toxică decât coniina. În primul an de vegetaţie, γ-coniceina, precursorul nesaturat, este dominantă cantitativ. În anul al II-lea, creşte cantitatea de coniină şi metil-coniină, alcaloizi piperidinici saturaţi, în special în frunze şi fructe. Coniina, dar în special metil-coniina sunt mai puţin toxice decât γ-coniceina. Omul o ingeră accidental prin confuzie cu morcovul sau cu păstârnacul. Simptomele sunt asemănătoare cu cele care apar la animale. Intoxicaţia severă poate cauza coma şi moartea prin insuficienţă respiratorie.

* Proprietăţile toxice ale cucutei sunt cunoscute din antichitate. Filosoful Socrates a murit în anul 399 î.C, după ce i s-a administrat un decoct puternic de cucută.

Alcaloidul din plantele tinere de *Ricinus communis*, *ricinina*, se găseşte şi în seminţe. Toxicitatea acestora se datorează în primul rând ricinei şi doar într-o mică măsură, ricininei.




Ricinina

Prin tratare cu baze, ricinina eliberează alcoolul metilic şi trece în derivatul hidroxi - *acidul ricinic*.

*Nicotina* este alcaloidul principal din plantele de tutun (*Nicotiana tabacum** şi *N. rustica*), unde se găseşte în amestec cu mai mult de alţi 10 alcaloizi. Este un lichid incolor, solubil în apă în orice proporţie la temperatură mai mică de 60°, proprietate folosită la izolare: distilează fără să se descompună. Se dizolvă în solvenţii organici. În timpul fermentării tutunului, nicotina suferă transformări, în special ale ciclului pirolidinic.

* Nicotina derivă din acidul nicotinic, o vitamină B denumită *niacină*. Niacina previne pelagra. Acidul nicotinic este convertit şi în nicotinamidă, un precursor al NADP (nicotinamid-adenin-dinucleotid fosfat), o enzimă vitală a procesului de fotosinteză. În reacţiile fotosintetice la lumină, NADP acceptă 2 atomi de H de la molecula de apă şi se formează $NADPH_2$, un agent reducător puternic, care converteşte $CO_2$ la glucoză în reacţiile la întuneric. Când cei 2 atomi de H se leagă cu NADP, se eliberează $O_2$, după reacţia:

$6\ CO_2 + 6\ H_2O$ (ATP şi $NADPH_2$ din reacţiile la lumină) $C_6H_2O_6 + 6\ O_2$. ---

Denumirea de *Nicotiana* a fost dată de suedezul C. Line în onoarea ambasadorului francez J. Nicot, care a adus seminţele.

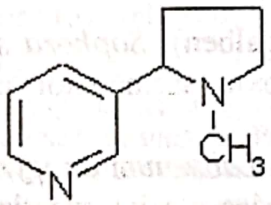
Scanned with OKEN Scanner

În doze mici, nicotina este stimulatoare a activităţii centrilor nervoşi şi a sistemului nervos periferic. Stimulează secreţia glandelor exocrine şi endocrine şi produce *vasoconstricţie*, cu creşterea tensiunii arteriale.

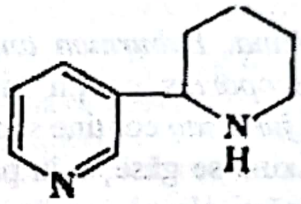
Nicotina este o toxină puternică. Doza letală pentru om este de circa 40 mg. Nicotina este toxică pentru insecte. S-a obţinut pe calea sintezei chimice, dar efectele sale sunt de circa 8 ori mai slabe decât ale nicotinei naturale.

Nicotina se găseşte şi la alte plante (*Lycopodium*), dar în cantităţi mici. În plantele de tutun, nicotina se găseşte sub forma sărurilor cu acizii citric şi malic. *Nicotiana tabacum* conţine 2% nicotină din greutatea uscată a plantei, iar *Nicotiana rustica* 8%.

În plante, nicotina se găseşte în amestec cu alte substanţe, alcaloizi şi nealcaloizi. Unul dintre alcaloizi este *anabasina*, alcaloidul principal al plantei *Anabasis aphylla* şi *nornicotina*, care se găseşte la speciile sălbatice de *Nicotiana*. Nornicotina este o nicotină căreia îi lipseşte grupul $-CH_3$ de la N.



Nicotina



Anabasina

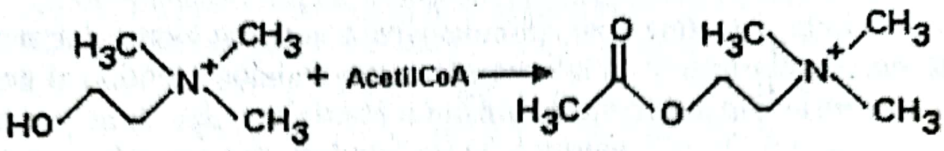
Fumul* de ţigară conţine nicotină şi alcaloizi din tutun, precum şi derivaţi rezultaţi prin descompunerea termică a acestora, care constituie gudronul, în care au fost identificate hidrocarburi cancerigene.

*Fumul de ţigară produce stresul oxidativ deoarece conţine milioane de radicali liberi. Gudroanele rezultate din ardere cresc rata formării radicalilor liberi. Fumătorii au nevoie de 4 ori mai multă vitamina C/zi. Răspunsul imun este represat datorită excesului de radicali imunosupresori produşi de neutrofile şi de macrofagele pulmonare. La fumători, neutrofilele pulmonare sunt numeroase, active şi produc radicalii $O_2$. Aceleaşi efecte se produc la nefumătorii care inspiră aerul viciat. Conservarea frunzelor implică procese biochimice fermentative (conversia amidonului în glucide simple) şi reducerea conţinutului de apă de la 80% la 20%. Se adaugă ingrediente care conferă miros şi aromă (zaharuri, rom, mentol). Unii dintre compuşi (cumarina) sunt carcinogeni prin ardere. Cele mai multe varietăţi cultivate sunt tetraploide: au frunze, flori şi fructe mai mari, ceea ce conferă un avantaj economic evident.

Alcaloizii piridinici şi piperidinici influenţează activitatea SNC, reduc apetitul, stimulează diureza şi sunt diaforetici (stimulează transpiraţia fiziologică sau patologică). Alcaloizii piridinici – anabasina, nicotina din *Nicotiana tabacum* produc efecte teratogene asupra dezvoltării membrelor embrionilor la scroafele gestante în primele 15 zile, care se hrănesc cu tulpinile plantei.

Molecula de nicotină şi cea de *acetilcolină* se aseamănă structural: ambele au un atom de N cuaternar cu sarcină negativă, considerat a fi responsabil pentru activitatea biologică asemănătoare a celor 2 molecule. În molecula de citizină, atomul de N din inelul de C are de asemenea sarcină negativă.

Scanned with OKEN Scanner




Colină Acetilcolină

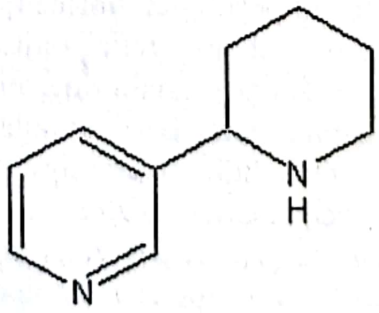
Studiile clinice şi toxicologice efectuate în mai multe ţări au dovedit că fumatul are efecte profund defavorabile asupra tuturor organelor şi sistemelor din organism. Pentru sistemul cardiovascular există riscul infarctului miocardic, stenocardic, al maladiilor sistemului vascular periferic, respirator (cancer pulmonar, traheobronşită). La fumătorii pătimaşi se creează de asemenea dependenţa fiziologică şi psihică*.

* Tratamentul dependenţei de nicotină este complex, iar terapia ocupă un loc important. Firma de medicamente Sopharma produce medicamentul *Tabex*, pe baza alcaloidului citizină, cu acţiune asemănătoare nicotinei.

*Citizina. Laburnum anagyroides* (salcâmul galben), *Sophora secundiflora*, *Cytisus scoparius* conţin citizina, un alcaloid toxic asemănător nicotinei, iar *Spartium junceum* conţine sparteina.

Citizina se găseşte în păstăile şi seminţele de *Laburnum anagyroides*, dar şi celelalte părţi ale plantei sunt toxice. Semnele clinice ale intoxicaţiei cu citizină sunt asemănătoare cu cele produse de nicotină: starea de excitaţie, pierderea parţială a coordonării motorii, salivaţie, stare generală alterată, emeză, diaree, lăcrimare, eventual midriază. În formele grave apar convulsiile, tremurul, pareza, paralizia, care pot fi urmate de tahicardie, colaps, comă, moarte.

*Mecanismul de acţiune* al citizinei este asemănător cu al nicotinei, dar are toxicitate mai mică. Citizina se poate substitui nicotinei: scurtează perioada de interacţiune a nicotinei cu receptorii de acetilcolină, rezultatul fiind reducerea gradată a cantităţii de nicotină şi eliminarea ei la fumătorii cu dependenţă fiziologică. Receptorii nicotinici de acetilcolină se găsesc la nivelul sinapsei neuromusculare şi formează o familie de canale de cationi dependente de liganzi, care sunt activaţi de nicotină şi sunt clasificaţi pe baza structurii subunităţilor: s-au clonat 10 subunităţi α (α1-10) şi 4 subunităţi β (β1-4) din celulele mamaliene şi aviare. Alte subunităţi asociate receptorilor nicotinici de acetilcolină sunt γ, δ şi ε.




Citizina

Scanned with OKEN Scanner

Intoxicaţia cu *Cytisus* produce senzaţie de arsură a tractului digestiv, starea de rău general, somnolenţă, dureri de cap, febră. În cazurile grave apar stări halucinante, convulsii, urmate de coma fatală.

*Alcaloizii din grupa tropanului* conţin un atom de N metilat (N-$CH_3$) şi sunt foarte diversificaţi din punct de vedere chimic. S-au izolat peste 25 de alcaloizi din plantele familiilor *Solanaceae, Convolvulaceae, Dioscoraceae, Erytroxylaceae,* unde se găsesc într-un amestec foarte complex cu alte tipuri de alcaloizi. Sunt esteri prin hidroliza cărora rezultă un acid şi un aminoalcool. Aminoalcoolii derivă de la amina terţiară biciclică *tropan* şi se deosebesc între ei prin conţinutul în oxigen.

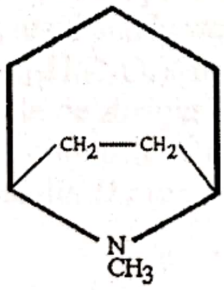
Toate ţesuturile plantelor de *Datura* (frunze, tulpina, rădăcina şi fructele) conţin mai mulţi alcaloizi a căror structură de bază este *tropanul,* cei mai puternici fiind *atropina, hiosciamina* şi *scopolamina.*

În funcţie de doză, alcaloizii din familia tropan, produşi de *Datura* pot avea acţiune sinergică, producând halucinaţii*, delir şi moarte. Sunt solubili în lipide şi se absorb uşor prin piele şi membranele mucoase.

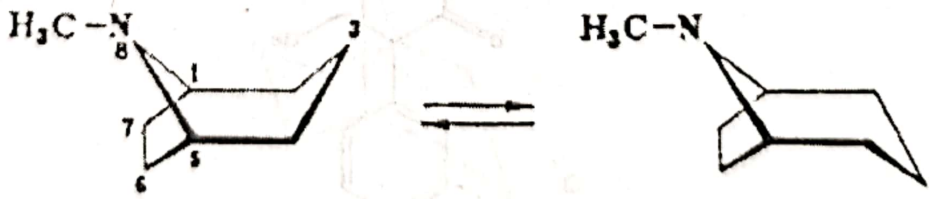
* Halucinaţia (din latinescul *hallucinatio*) este o stare de tulburare psihică în cursul căreia persoana are convingerea că percepe obiecte, fenomene sau fiinţe, fără ca acestea să existe în realitate. Tulburările pot afecta toate simţurile. Produsul percepţiei senzoriale alterate este vedenia, nălucirea.

În timpul ritualurilor religioase, în India antică, seminţele de *Datura* erau consumate de preoţi pentru a-şi induce stări halucinogene, profetice şi oraculare. Se presupune că fumul toxic inhalat de preoţii greci acum 2000 de ani la oracolul din Delhi, a fost *Datura*. Prostituatele în India adăugau seminţele de *Datura* în băutură pentru proprietăţile lor afrodisiace (substanţe care stimulează centrii nervoşi ce controlează impulsurile sexuale).

Alcaloizii tropan din *Hyosciamus niger, Duboisia* sp., *Mandragora officinarum* se folosesc ca „remedii" oferite de vrăjitoare şi în medicina populară. Medicii greci şi romani au folosit *Datura* în amestec cu opiul ca sedativ şi anestezic general în chirurgie.




*Alcaloizii tropanici* au un atom de N metilat (N-$CH_3$). Această structură chimică se găseşte în serotonină, unul dintre mediatorii sinapselor neuro-neuronale şi neuro-musculare.

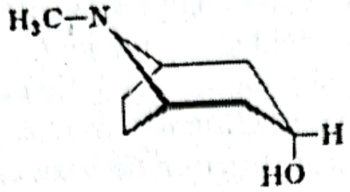



Tropan - forma „baie" şi „scaun".

Derivaţii tropanului au o grupare OH în poziţia 3, esterificată. Tropanul stă la baza unui grup de alcaloizi care se deosebesc prin modul în care acest nucleu este substituit în poziţiile 3, 6 şi 7. Molecula tropanului nu este plană şi din această cauză

prezintă două forme (baie şi scaun), cu o distribuţie spaţială diferită a atomilor de C. Cele două forme trec cu uşurinţă din una în alta şi se izolează o singură formă de tropan. Prin hidroliza alcaloizilor tropanici, datorită legăturii esterice rezultă un *acid* şi un *aminoalcool* de tip tropanic, cu o grupare OH în poziţia 3.

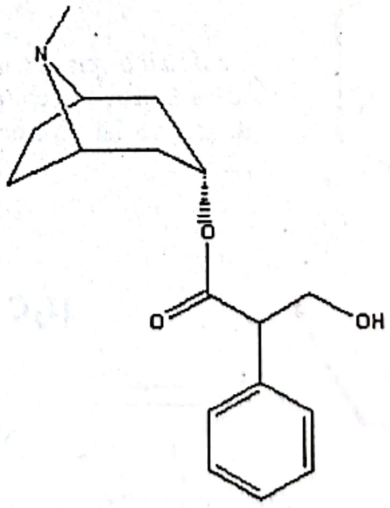
Unul dintre aminoalcoolii naturali este *tropina*, o bază terţiară cu o grupare N-$CH_3$ (N-metil) şi un OH alcoolic.




Tropina

Aceşti alcaloizi influenţează activitatea neuronilor SNC, somatici şi vegetativi, ceea ce explică modificările ritmului cardiac, ale circulaţiei şi respiraţiei. Acţiunea alcaloizilor la nivel celular este complexă şi este determinată de structura moleculară, în special de gruparea N-$CH_3$. Această structură chimică este proprie acetilcolinei (un mediator sinaptic al sinapselor neuro-neuronale şi neuro-musculare). Proprietăţile *anestezice* ale alcaloizilor tropanici s-ar datora interferenţei lor cu acetilcolina, probabil prin competiţie pentru receptorii sinaptici de acetilcolină, blocând astfel propagarea impulsurilor nervoase.

*Atropa belladona* (mătrăguna), *Hyosciamus niger* (măselariţa), *Datura stramonium* (ciumăfaia), toate aparţinând familiei *Solanaceae*, conţin alcaloizi înrudiţi structural, cei mai importanţi fiind *atropina, hiosciamina* şi *scopolamina*. Hiosciamina este forma sub care se găseşte atropina în ţesutul vegetal. Atropina se formează din hiosciamină prin racemizare.




Hiosciamina

*Atropina* ($C_{17}H_{23}NO_3$), un *ester* al tropinei, este alcaloidul cel mai important din planta *Atropa belladona*. Prin hidroliza atropinei se formează tropina şi acidul tropic. Este o substanţă cristalină, care se găseşte ca atare în ţesutul vegetal.

Scanned with OKEN Scanner

În preparatul comercial, atropina este totdeauna asociată cu o mică proporţie de hiosciamină, extrasă concomitent, de care nu poate fi uşor separată. *Atropa belladona* este o plantă ierboasă perenă. Toate organele plantei conţin alcaloidul şi sunt otrăvitoare. Plantele din primul an de vegetaţie conţin numai jumătate din cantitatea de atropină a plantei de 3–4 ani. Rădăcinile tinere conţin numai hiosciamină, iar cele bătrâne conţin hiosciamină şi atropină. Pentru extracţia alcaloidului, frunzele plantelor de 2–4 ani trebuie recoltate în timpul înfloririi. Înainte de înflorire, planta nu este bogată în alcaloid. Frunzele trebuie să fie proaspete, pentru că odată cu îmbătrânirea, constituienţii activi se descompun, cu eliberarea $NH_4^+$. Rădăcinile se recoltează primăvara sau toamna, de la plante de cel puţin 3 ani. Planta sălbatică conţine o cantitate mai mare de alcaloid decât planta cultivată. Înflorirea şi înfrunzirea nu diminuă cantitatea de alcaloid din rădăcini. De aceea, rădăcina poate fi recoltată concomitent cu frunzele.

Constituienţii principali ai plantei sunt *atropina* şi *hiosciamina* ($C_{17}H_{23}NO_3$).

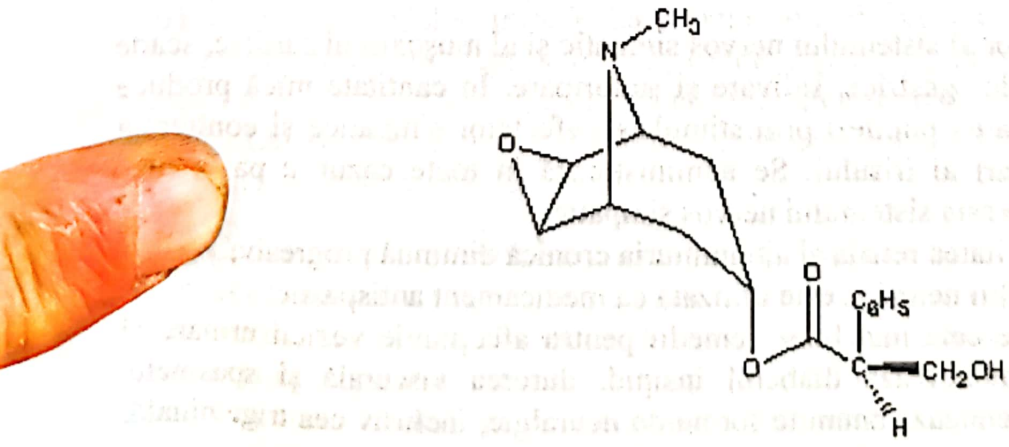
*Hiosciamina* este componentul principal al rădăcinii de *Atropa belladona.* Se deosebeşte de atropină numai prin aceea că în molecula ei, acidul tropic se găseşte sub formă levogiră. În natură se găseşte în cantităţi mult mai mari decât atropina. Se converteşte în atropină chiar în ţesuturile plantei prin racemizare* sau sub acţiunea cădurii. Efectul major al hiosciaminei este depresia SNC.

* Atropina şi hiosciamina sunt forme racemice. Racemazele sunt enzime care realizează conversia reversibilă a celor două forme moleculare cu activitate optică (levo şi dextro).

*Atropamina* ($C_{17}H_{23}NO_2$) se obţine prin acţiunea acidului nitric asupra atropinei şi este convertibilă în *beladonină* ($C_{17}H_{21}NO_2$) sub acţiunea HCl sau KOH.

Beladonina este un alcaloid amorf şi se obţine din hiosciamină sau atropină prin încălzire de la 120 la 130°, pentru câteva ore. Prin creşterea gradată a temperaturii, are loc transformarea, rezultând hiosciamina, atropina, atropamina şi beladonina.

*Hioscina* ($C_{17}H_{17}NO_4$) descoperită în ţesuturile de *Hyosciamus niger*, se găseşte în rădăcinile de *Atropa belladona* în cantităţi mici. Este identică cu *scopolamina*, un alcaloid obţinut din rădăcinile de *Scopolia atropoida*. Scopolamina este alcaloidul principal din *Datura metel*, din care se obţine pe cale industrială.




Scopolamina

Dozele mici de atropină au acţiune puternică asupra sistemului nervos parasimpatic, efectul principal fiind relaxarea muşchilor netezi, midriaza fiind efectul cel mai evident. Se foloseşte ca medicament antispastic. Scade secreţia gastrică, a glandelor salivare şi sudoripare, inhibă activitatea SNC.

În doze mari, alcaloizii din *Atropa belladona* sunt substanţe toxice, cu acţiune narcotică. Dozele *mari* de atropină produc paralizii. Intoxicaţia este fatală pentru om şi carnivore, dar aceleaşi doze au efecte diminuate asupra păsărilor şi ierbivorelor. Câinele suportă cantităţi relativ mari ale acestui alcaloid. Copiii se intoxică cu fructele pe care le confundă cu cireşele.

În doze mari, alcaloizii tropanici acţionează asupra SNC, având proprietăţi halucinogene. Efectele sunt stimulatoare şi halucinante, manifestându-se prin dilatarea pupilelor* (midriază), prezbiopie, scăderea acuităţii vizuale, iluzii vizuale (fantasme), orbire, perturbări ale auzului, amorţirea feţei, starea de confuzie mentală, vertigo şi delir, senzaţia de uscare a gurii şi gâtului cu dificultăţi de deglutiţie şi vorbire, constricţia muşchilor gâtului, stare de rău general, vomă, eritemul şi edemul feţei, iritarea organelor urinare sau erupţie exantematică. Hiosciamina produce efecte fiziologice asemănătoare, dar mai ample.

Dozele mari produc o succesiune rapidă şi violentă a simptomelor, cu delir, urmat de stare de somnolenţă. Dacă se produce, moartea survine prin comă.

* Una dintre modificările vegetative induse de atropină este *dilatarea pupilei*, considerată altădată ca o privire misterioasă a femeilor italiene. În traducere, *belladona* are semnificaţia – doamnă frumoasă, pentru că sucul de *Atropa* s-a folosit sub forma picăturilor pentru dilatarea ochiului.

Remediul intoxicaţiei cu *Atropa belladona* este inducerea reflexului de emeză şi purgativele. *Atropa belladona* şi opiul par să exercite influenţe antagonice. De aceea, opiul a fost recomandat ca remediu. În toate cazurile de intoxicare cu *Atropa belladona*, remediul este morfina. Utilizarea ei este impusă de gradul de contracţie pupilară.

Dozele mici de atropină stimulează activitatea SNC.

Dozele *terapeutice* de atropină exercită efecte stimulatoare, opuse faţă de dozele toxice:

- este un stimulator al sistemului nervos simpatic şi al muşchiului cardiac, scade secreţia glandelor gastrice, salivare şi sudoripare. În cantitate mică produce *midriază* (dilatarea pupilei) prin stimularea efectelor simpatice şi contracţia muşchilor radiari ai irisului. Se administrează în toate cazurile patologice asociate cu depresia sistemului nervos simpatic;
- stimulează activitatea renală şi albuminuria cronică diminuă progresiv;
- relaxează muşchii netezi şi este utilizată ca medicament antispastic;
- este unul dintre cele mai bune remedii pentru afecţiunile vezicii urinare şi rinichiului. Ameliorează diabetul insipid, durerea viscerală şi spasmele. Dozele mici atenuează anumite forme de nevralgie, inclusiv cea trigeminală. Atropina contracarează efectele gazelor neuroparalizante.

Scanned with OKEN Scanner

Proprietăţile anestezice ale alcaloizilor tropan se datorează interferenţei lor cu acetilcolina*, probabil prin competiţia cu receptorii sinaptici, astfel blocând sau inhibând transmiterea impulsurilor nervoase.

* Celula nervoasă se conectează cu un neuron adiacent prin intermediul prelungirilor axonale. Axonul se ramifică în terminaţii butonate, fiecare dintre ele legându-se de neuronul adiacent. Terminaţiile nervoase sunt butonate şi conţin acetilcolină. Sub acţiunea potenţialului de acţiune, acetilcolina difuzează prin fanta sinaptică (0,02 µm) şi activează neuronul adiacent. Pe membrana postsinaptică, acetilcolina este degradată sub acţiunea acetilcolinesterazei şi potenţialul de acţiune este transmis. Insecticidele organofosforice (malathion şi parathion) se leagă de situsurile active ale enzimei, prevenind transmiterea impulsului şi perturbând controlul nervos al insectelor. Gazele toxice folosite în cel de-al doilea război mondial aveau efecte asemănătoare.

*Solubilitatea în lipide* a alcaloizilor tropan este o proprietate folosită ca remediu al „răului de mare". Cantităţi mici de scopolamină sunt eliberate în sânge timp de circa 3 zile. Efectul alcaloidului constă în inhibiţia reflexului de vomă, probabil datorită acţiunii sale anticolinergice în SNC.

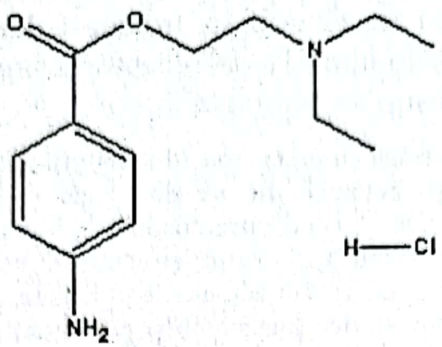
Se cunosc circa 25 de specii de *Datura*. Plantele se numesc „mărul cu spini", deoarece capsula purtătoare a seminţelor este prevăzută cu spini. Majoritatea sunt plante mici ierboase, arbuşti sau târâtoare, anuale sau perene, iar unele sunt arbori de până la 11 m înălţime. Cele arboricole sunt cultivate ca plante ornamentale şi sunt grupate în genul *Brugmansia*. Florile au formă de trompetă şi sunt colorate variat (roşu, galben etc.). Ambele genuri aparţin familiei *Solanaceae*.

Substanţele toxice în ţesuturile de *Datura* sunt alcaloizi: unul *indolic*, asemănător cu psilocina din ciuperci şi *solanina*. Dacă se găseşte accidental printre plantele medicinale ierboase, *Datura* produce halucinaţii.

Fiind solubili în lipide, alcaloizii tropan se absorb rapid prin tegument şi prin mucoase. Intoxicaţia cu *Datura stramonium* produce o senzaţie intensă de sete, tulburări de vedere, dureri de cap, stare de rău general, febră, creşterea presiunii arteriale, halucinaţii şi uneori convulsii, comă şi moarte. Simptome uşoare sunt produse chiar de parfumul florilor. Consumul a 5 g de frunze sau de seminţe este fatal pentru copil. Seminţele, florile şi frunzele de *Datura stramonium* sunt toxice. Copiii sunt atraşi de florile mari şi se intoxică cu nectarul de la baza florilor sau după ingestia seminţelor. Intoxicaţia la om este mai frecventă decât la animale. Se pot intoxica bovinele, caprinele, caii, ovinele, porcii, păsările de curte. Datorită mirosului puternic şi gustului neplăcut, animalele o consumă numai în absenţa hranei. La bovine simptomele sunt: pierderea coordonării motorii, agitaţie, creşterea ratei respiratorii.

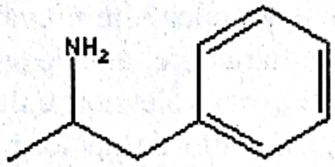
*Cocaina* din *Erythroxylon coca* este un alcaloid tropan. Este un ester al unui aminoacid hidroxilat (ecgonina), cu alcoolul metilic şi acidul benzoic. S-a folosit ca anestezic local după injectarea în tegument sau în ţesutul muscular, fapt ce a condus la descoperirea şi sinteza compusului mai puternic – *novocaina*, folosit în dentistică. Este stimulatoare a activităţii nervoase şi acţionează prin *blocarea transmiterii impulsurilor* la nivelul sinapselor, ceea ce produce o stare de euforie.

Scanned with OKEN Scanner



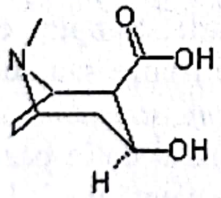

Novocaina

*Amfetamina* produce efecte asemănătoare, dar mecanismul de acţiune constă în stimularea eliberării mediatorilor sinaptici. Activarea sistemului nervos simpatic într-un timp scurt tinde să crească starea de dispoziţie, motivaţia şi mobilizează rezervele energetice ale organismului. Este un drog care dă senzaţia de forţă fizică şi stimulează acuitatea mentală.

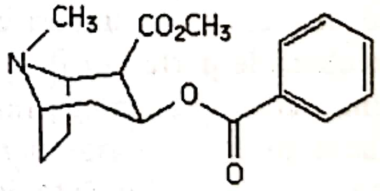



Amfetamina

Medicamentele psihostimulatoare prezintă riscuri potenţiale adverse mari, fizice şi psihice. În doze mari sau prin repetarea dozelor mici, efectul este toxic. Prin hidroliză cu apă fierbinte, legătura esterică cu metanolul se rupe şi cocaina trece în *ecgonină* şi alcool metilic.




Ecgonina

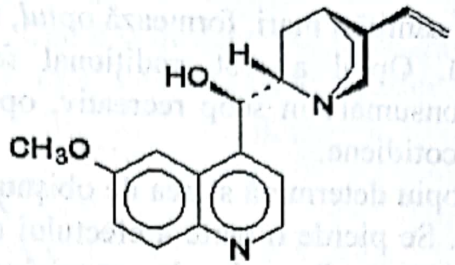



Cocaina

Cocaina este alcaloidul cel mai utilizat în industria farmaceutică. Se obţine prin hidroliza întregului extract din ţesutul vegetal.

Acţiunea fiziologică a cocainei se exercită asupra sistemului nervos periferic. În doze mari apare paralizia SNC. Este un alcaloid cu acţiune psihotropă, deoarece produce obişnuinţă.

*Alcaloizii cu nucleu chinolinic,* structural sunt formaţi dintr-un inel dublu de C cu un atom de N. *Chinina* se găseşte în coaja unor arbori din genul *Cincona* (arborele de chinină – familia *Rubiaceae*). Locuitorii din regiunea Anzilor au folosit-o ca remediu împotriva malariei. Alcaloizii principali din coaja arborilor de chinină sunt *chinina, cinconina* şi *chinidina.*




Chinina

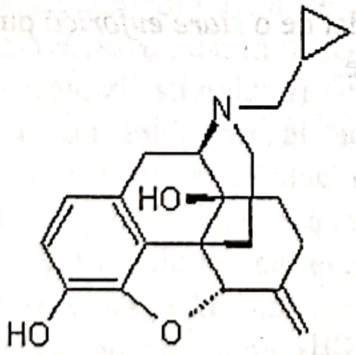
*Chinina* se foloseşte ca medicament antimalaric, dar are şi efect antipiretic general (acţionează asupra centrilor hipotalamici ai termoreglării). Chinina este toxică pentru *Plasmodium vivax* şi alte 3 specii, toate fiind agenţii malariei. Parazitul invadează eritrocitele, se multiplică şi le lizează. Malaria este răspândită în regiunile tropicale şi este transmisă prin înţepătura ţânţarului *Anopheles*. Arborele de chinină se cultivă în plantaţii, deşi multe medicamente antimalarice s-au sintetizat pe cale chimică (atabrina, clorochina, primachina).

*Alcaloizii cu nucleu izochinolinic* conţin un inel dublu de C cu un atom de N. Sunt alcaloizii narcotici ai plantelor din familiile *Papaveraceae, Fumariaceae, Chenopodiaceae, Cactaceae*.

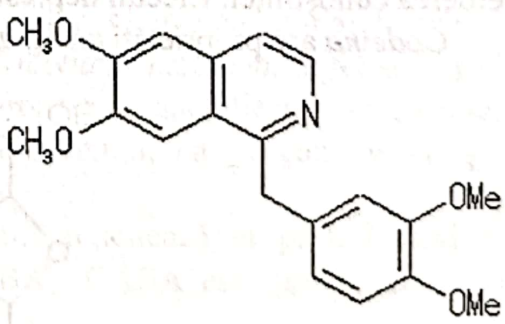
Proprietăţile narcotice se referă la atenuarea durerii şi la inducerea somnului, care caracterizează acţiunea morfinei, codeinei, tebainei.

Izochinolina parţial hidrogenată leagă diverse grupări neciclice. În sucul de culoare albă al fructelor necoapte ale unor specii de mac, în special *Papaverum somniferum*, se găseşte un amestec de alcaloizi (*papaverina, narcotina, morfina, codeina* etc.), care poartă denumirea generică de *opiu*.

*Papaverina* cristalizează sub formă de prisme sau ca structuri aciculare.




Narcotina




Papaverina

Toate speciile de mac sunt toxice pentru om, dar nu toate conţin opiu. Capsulele rotunde conţin seminţe mici, negre, utilizate pentru proprietăţile lor condimentare. Seminţele de mac sunt comestibile şi inofensive, dar toate celelalte părţi ale plantei conţin alcaloizi. Alcaloizii, în special morfina şi codeina, care în

macul asiatic se găsesc în cantităţi mari, formează *opiul*, un drog răşinos psihotrop, care creează dependenţă. Opiul a fost tradiţional folosit pentru tratamentul depresiei melancolice. Consumate în scop recreativ, opioidele produc o stare de deconectare de realităţile cotidiene.

Dozele repetate de opiu determină starea de obişnuinţă: organismul tolerează doze progresiv crescânde. Se pierde o parte a efectului analgezic şi euforizant, pe măsură ce se instalează toleranţa. Supradozele pot produce depresia respiratorie. În contrast, durerea fizică este un stimulator respirator puternic.

Consumul excesiv de narcotice inhibă eliberarea opioidelor endogene.

Papaverina se găseşte în opium, în cantitate mică, dar se obţine pe cale sintetică. Are acţiune antispastică nespecifică, ce se exercită direct asupra muşchilor netezi, spre deosebire de atropină ce acţionează prin intermediul sistemului nervos parasimpatic.

Narcotina a fost izolată din opiu, în amestec cu alţi alcaloizi. Este solubilă în benzen şi pe baza acestei proprietăţi s-a separat de morfină, alcaloidul din opiu greu solubil în benzen.

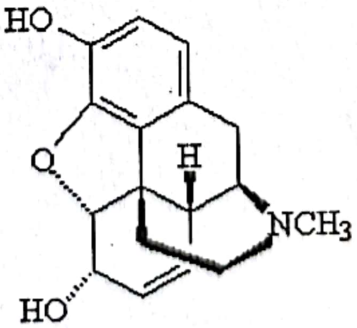
Alcaloizii din grupul *morfinei**: morfina, codeina, tebaina. Morfina este o *amină terţiară*, cu o grupare metil legată de atomul de N. Unul dintre cei 3 atomi de oxigen aparţine unui grup OH fenolic, care-i conferă solubilitate în mediul alcalin. Este alcaloidul principal din opiu, cu o concentraţie medie de 9%.

* Denumirea de *morfină* vine de la Morfeus – zeul somnului.

Dacă la o soluţie de morfină în HCl diluat se adaugă câteva picături de nitrit de sodiu 1% şi după câteva minute se alcalinizează cu $NH_3$ diluat, rezultă culoarea roşie. Codeina nu dă această culoare, ceea ce constituie un test de diferenţiere.

*Morfina* acţionează asupra SNC şi produce efecte analgezice (pierderea sensibilităţii la stimuli dureroşi). În doză mare are efecte *narcotice* intense, cu pierderea cunoştinţei. Efectul depresiv este precedat de o *stare euforică* puternică.

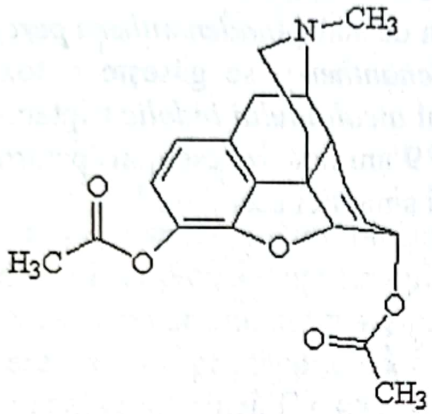
*Codeina* are proprietăţi analgezice inferioare.



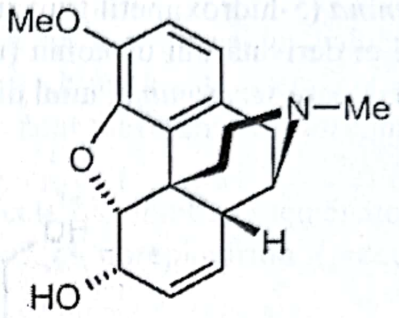

Morfina

*Heroina* este un drog ilicit, un concentrat de opiu. Structural, heroina este *derivatul diacetilat al morfinei*, iar *codeina* este eterul monometilic al morfinei la

gruparea OH fenolică. Codeina nu este solubilă în hidroxizii alcalini, nu are proprietăţile narcotice ale morfinei, iar cele analgezice sunt mult diminuate.




Heroina




Codeina

Heroina se găseşte în *Sanguinaria canadensis*, o plantă care conţine mulţi alcaloizi comuni papaveraceelor. Ingestia accidentală a frunzelor de *Sanguinaria* are consecinţe grave: senzaţia de vomă, pierderea cunoştinţei şi comă fatală.

Morfina şi codeina au aplicaţii în farmacoterapie. Totuşi, majoritatea intoxicaţiilor şi deceselor la om sunt consecinţa abuzului deliberat de opium, heroină şi a altor produse din mac.

Efectele opiumului sunt asemănătoare cu ale unor compuşi prezenţi în mod natural în SNC, care acţionează ca sedative, analgezice şi antidepresive. De aceea, intoxicarea cu mac produce un comportament eratic (deviant), pierderea apetitului alimentar, stare de confuzie mentală şi comă. Supradozele de opiu sau ale derivatelor sale produc moartea prin insuficienţă respiratorie.

Alcaloizii din opiu se găsesc şi în alte plante: *Argemone, Dicentra*. S-a sintetizat *demerol*, dar morfina naturală este cel mai bun atenuator al durerii.

Alcaloizii stimulatori (*nicotina* din *Nicotiana tabacum*, *cafeina* din *Coffea arabica* sau inhibitori ai activităţii neuronale (tranchilizanţi – *cocaina* din *Erythroxylum coca*) produc obişnuinţa consumului, ca argument în sprijinul afirmaţiei că alterează starea mentală.

Agenţii chimici cu efect tranchilizant acţionează în primul rând asupra *receptorilor de acid γ-amino-butiric* (GABA). GABA este principalul mediator sinaptic cu funcţie inhibitorie din SNC.

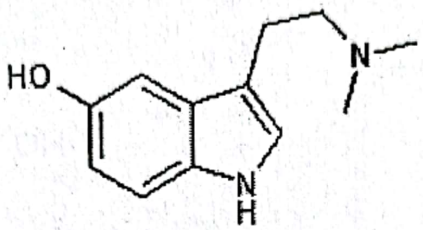
Efectele puternice ale acestor alcaloizi asupra sistemului nervos uman au avut consecinţe importante: utilizarea lor ca medicamente atenuante ale durerii, ca medicamente psihotrope sau practici vicioase ale celor care ignoră proprietăţile puternice ale acestor substanţe chimice.

*Alcaloizii indolici* derivă din triptofan, conţin un inel indolic şi au răspândire limitată. Se găsesc în alcaloizii fungici ergina şi psilocibina, în serotonină şi în

Scanned with OKEN Scanner

LSD. Aceşti compuşi pot să intre în competiţie cu serotonina din creier. Cu excepţia câtorva halucinogeni, alcaloizii indolici (serotonina, rezerpina) au efecte sedative. Alţi compuşi din această clasă au efecte citostatice antileucemice.

În seminţele unei leguminoase din America de sud (*Anadenanthera peregrina*, a nu se confunda cu planta leguminoasă *Adenanthera*) se găseşte o toxină – *bufotenina* (5-hidroximetil triptamina), derivat al *alcaloidului indolic* triptamina, la rândul ei derivată din triptofan (unul dintre cei 9 aminoacizi esenţiali pentru om), asemănătoare *serotoninei*, unul dintre mediatorii sinaptici esenţiali.




Bufotenina

După injectarea bufoteninei sintetizată chimic se produce o eliberare a serotoninei în sânge. Suplimentul alimentar 5-HTP este 5-hidroxitriptofanul, un precursor metabolic al serotoninei, utilizat ca medicament pentru tratarea stărilor depresive şi insomniilor.

Bufotenina injectată la subiecţii umani schizofrenici* a produs hiperserotoninemie (eliberarea serotoninei în sânge). Este halucinogenă şi nu are utilitate farmacologică.

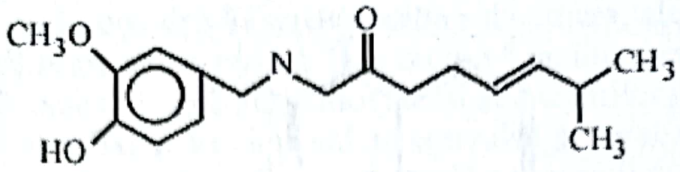
* Boală mintală cronică, caracterizată prin slăbirea şi alterarea progresivă a funcţiilor psihice şi prin pierderea contactului cu realitatea.

Bufotenina este un compus care se găseşte în regnul vegetal şi animal. În natură sunt multe variante modificate ale bufoteninei, în special în tegumentul de broască din genul *Bufo*: bufoviridina (esterul bufoteninei cu acidul sulfuric), mai polară decât bufotenina şi mai puţin probabil să ajungă în creier; bufotenidina, bufotionina, bufogeninele etc. Bufogeninele sunt lactone steroidice fără N din veninul glandelor tegumentare de broască, toxice pentru muşchiul cardiac.

*Alcaloizi fără atomi de N heterociclici.* Atomii de N ai moleculei nu sunt legaţi în inelul de C, ci sunt localizaţi într-o catenă laterală de C: *capsicina* şi *mescalina.*

Seminţele *piperului* (*Capsicum pubescens, Capsicum baccatum, Capsicum annuum, Capsicum frutescens, Capsicum chinense*) conţin alcaloidul *capsicina*, stimulator puternic al mugurilor gustativi ai omului. Alcaloidul nu este toxic, nu este scindat de enzimele tractului digestiv şi de aceea arsurile gastrice se resimt la câteva ore după consum.

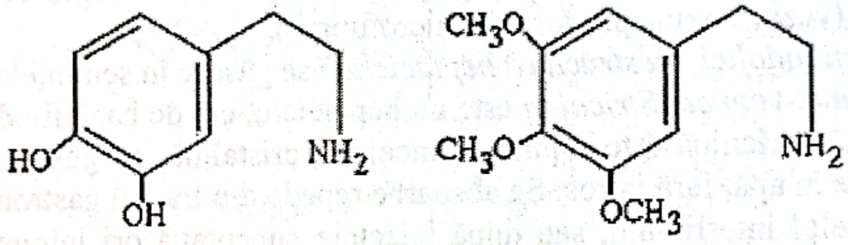
Scanned with OKEN Scanner



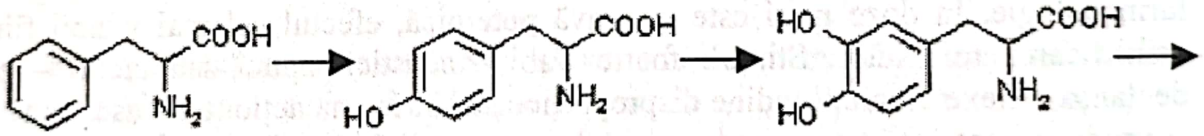

Capsicina

*Lophophora williamsii*, un cactus mic fără spini produce un halucinogen deosebit de puternic, *mescalina*, a cărui structură chimică este asemănătoare cu aceea a *dopaminei* (neurotransmiţător), cu a neurohormonului *norepinefrina* (noradrenalina) şi cu a stimulatorului amfetamina.

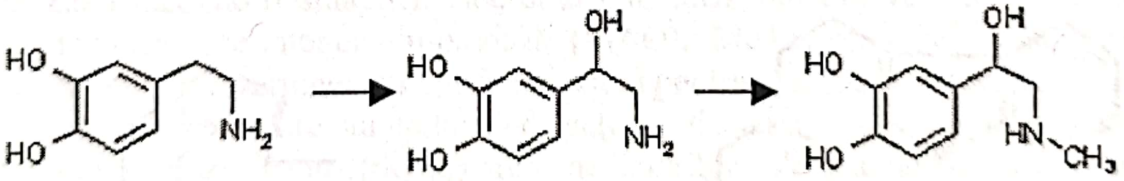
Mescalina se sintetizează din tirozină pe o cale biosintetică asemănătoare cu cea care la om produce epinefrina (adrenalina) şi norepinefrina (precursorul demetilat al epinefrinei, fig. 45).




Dopamina Mescalina




Fenilalanina Tirozina Hidroxi-tirozină



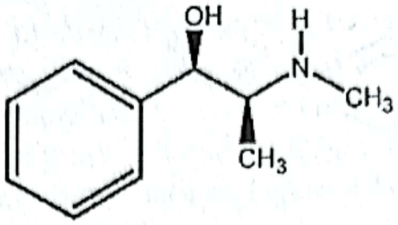

Dopamina Noradrenalina Adrenalina (Epinefrina)

Fig. 45 – Calea sintezei adrenalinei.

Dopamina şi precursorul ei, L-Dopa, derivă de asemenea pe o cale a metabolismului tirozinei.

*Efedrina*, alcaloidul din *Ephedra sinensis* are o structură moleculară asemănătoare cu a mescalinei, folosit ca decongestionant în stările alergice şi ca remediu al febrei de fân. Efedrina are o structură chimică asemănătoare cu a epinefrinei (adrenalina).

Scanned with OKEN Scanner

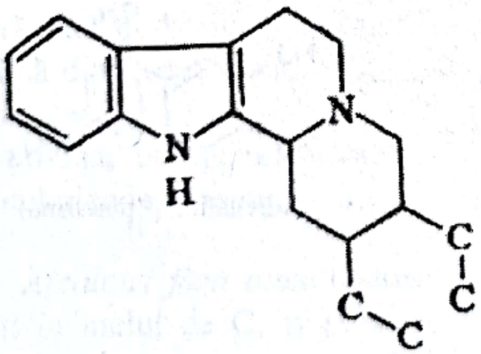



Efedrina

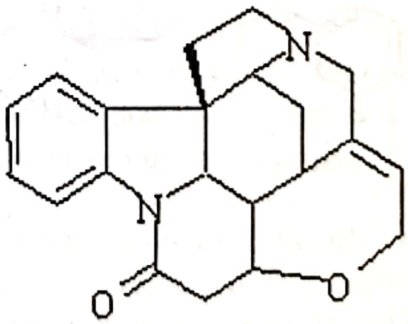
Are acţiune cardiostimulatoare, al cărei rezultat poate fi oprirea inimii la copii şi la adulţii cardiaci. Medicamentele sintetice cu structura efedrinei sunt bronhodilatatoare. Adrenalina (epinefrina) este adeseori administrată victimelor înţepăturii himenopterelor, în special a celor hipersensibili la proteinele din veninul de albină şi viespe, pentru prevenirea efectelor grave ale şocului anafilactic.

Alcaloizii cu *nucleu indolic*, condensat cu un al doilea inel heterociclic azotat: alcaloizii din ergotul de *Claviceps purpurea* şi din *Rauwolfia* se folosesc ca medicamente (vezi „Toxine produse de microfungi").

*Alcaloizii indolici cu structură heptaciclică* se găsesc în seminţele şi frunzele de *Strychnos nux-vomica*. *Stricnina* este un heptaciclu, cel de bază fiind *indolul*. În stare purificată, stricnina este o pulbere incoloră, cristalină, cu gust amar metalic după dizolvare în apă, fără miros. Se absoarbe repede din tractul gastrointestinal, în special la nivelul intestinului, sau după injectare subcutană ori intramusculară şi atacă SNC. După injectare, efectele se manifestă în 15–30 de minute, iar după ingestie, într-o oră. În doze mici este un tonic general cu utilizare largă în farmacologie. În doze mari este o otravă puternică, efectul cel mai vizibil fiind amplificarea reflexelor. Stimuli foarte slabi – acustici, optici sau tactili – pot declanşa reflexe cu amplitudine disproporţionată. Stricnina acţionează asupra SNC şi produce contracţii tetanice ale muşchilor, cu paralizia nervilor motori, asemenea curarei. Diminuează mobilitatea leucocitelor până la anulare.




Structura de bază a alcaloizilor policiclici. Ciclul principal este indolul



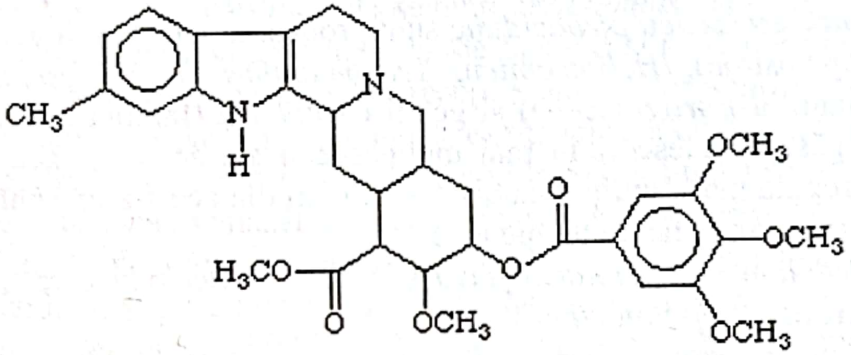

Structura moleculară a stricninei

Doza letală pentru omul adult, pe cale orală, variază între 30–120 mg, dar este mai mică după injectare. Enzimele microsomale ale hepatocitelor metabolizează toxina, astfel că dozele administrate la interval de 24 de ore nu au efect cumulativ.

Scanned with OKEN Scanner

Stricnina este o otravă convulsivă (spre deosebire de curara, ale cărei efecte sunt paralizante), care se foloseşte ca raticid. Este o otravă rapidă şi mortală pentru om. Stricnina amplifică excitabilitatea muşchilor striaţi şi a centrilor medulari. Moartea survine ca rezultat al asfixiei. Victima suferă convulsii generalizate ale muşchilor striaţi, urmate de starea tetanică, cu creşterea amplă a presiunii sanguine.

Latexul multor genuri de plante conţine *alcaloizi*. Din *Rauwolfia* se extrage alcaloidul *rezerpina* din care se obţin medicamente antidepresive şi tranchilizante, medicamente utilizate în tratamentul schizofreniei, datorită acţiunii sale asupra SNC precum şi un medicament antitensiv foarte eficient. Toţi alcaloizii acestui grup au un schelet comun alcătuit din 19 atomi de C şi doi atomi de N, dintre care unul aparţine unui *ciclu indolic*.




Structura *rezerpinei*, alcaloidul de interes farmacologic din *Rauwolfia*

Rezerpina acţionează asupra SNC şi periferic, stimulând eliberarea mediatorilor dopamina şi noradrenalina în sinapsele centrale şi periferice, a adrenalinei în glandele medulosuprarenale şi a serotoninei în terminaţiile nervoase simpatice. Rezerpina produce leziuni ireversibile ale veziculelor intracelulare în care sunt depozitaţi mediatorii sinaptici. Neurotransmiţătorii trec din vezicule în celulă şi sunt inactivaţi de monoamin-oxidază (MAO). Mediatorii care se sintetizează ulterior acţiunii rezerpinei nu pot fi depozitaţi pentru o viitoare eliberare.

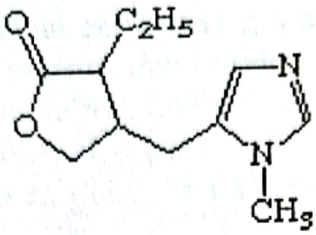
Medicamentul are durată lungă de acţiune, deoarece este necesară asamblarea unor noi vezicule pentru depozitarea mediatorilor. Veziculele vechi sunt lizate ireversibil. Scăderea depozitelor de catecolamine în terminaţiile adrenergice scade rata ritmului cardiac, iar tonusul vaselor periferice diminuă. Capilarele şi arteriolele se dilată, iar presiunea sanguină scade.

În SNC, scăderea dopaminei produce efectul sedativ şi ameliorează simptomele schizofreniei. Medicamentele moderne folosite în tratamentul bolilor psihice, blochează unul sau mai multe tipuri de receptori de dopamină, dar efectele sunt aceleaşi prin blocarea receptorilor sau prin eliminarea mediatorului.

Rezerpina poate produce tulburări digestive: agravează leziunile ulceroase deoarece stimulează secreţia gastrică acidă. La o doză mai mare de 1 mg/zi, produce stări de depresie.

Scanned with OKEN Scanner

*Alcaloizi cu nucleu imidazolic*. Pilocarpina se găseşte în frunzele de *Pilocarpus jaborandi* şi *Pilocarpus microphyllus*. Acţiunea fiziologică principală constă în activarea secreţiei glandelor salivare, lacrimale, sudoripare etc. Efectele sunt antagoniste atropinei. Structural, are un inel imidazolic şi un inel lactonic, legate printr-o grupare $CH_2$.



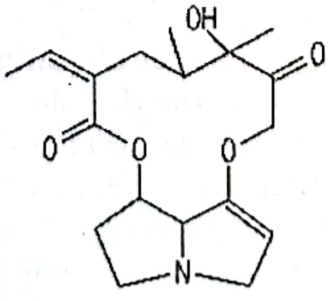
Pilocarpina

*Alcaloizii cu nucleu pirolizidinic* sunt produşi de plante din genurile *Senecio* (familia *Compositae*), *Heliotropium*, *Trachelanthus*, *Trichodesma*, *Symphytum* officinale (familia *Boraginaceae*) şi genul *Crotolaria* (familia *Leguminosae*). Un alcaloid se găseşte adeseori în mai multe specii ale aceluiaşi gen, iar o specie produce de regulă mai mulţi alcaloizi. Alcaloizii din acest grup sunt toxici pentru mamifere, dar nu au aplicaţii terapeutice.

*Heliotropium* şi *Crotolaria fulva* sintetizează alcaloizi care produc leziuni hepatice necrotice (*hepatotoxine).*

*Senecio jacoboea* şi *Senecio vulgaris* (contaminează lanul de grâu) sintetizează *alcaloizi pirolizidinici* (senecionina), care produc *ciroza hepatică,* ireversibilă la animalele care o ingeră. Planta este toxică pentru bovine, cal şi probabil pentru caprine. Alcaloidul trece în lapte şi are efect toxic la animalele tinere şi la om. Toate organele plantei conţin alcaloizi toxici, dar cea mai mare concentraţie se găseşte în flori. Toxicitatea pentru animale este argumentată de faptul că 50% dintre animalele moarte prin intoxicaţie au ingerat plante din familiile *Boraginaceae, Compositae* şi *Leguminosae* care conţin aceşti alcaloizi.

Alcaloizii pirolizidinici au acţiune *hepatotoxică* puternică: produc maladia *veno-ocluzivă* a ficatului, caracterizată prin ciroză datorită trombozei fibrozante a venelor hepatice, hiperplazia vezicii biliare, cancer hepatic primar, edemul mucoasei şi submucoasei stomacului şi intestinului. Alte simptome sunt agitaţia, pierderea coordonării motorii. Intoxicaţia gravă evoluează la starea de comă şi moarte.



Senecionina produsă de *Senecio vulgaris*

La animalele intoxicate aflate în lactaţie, producţia de lapte scade rapid: laptele dobândeşte gust amar şi miros neplăcut.

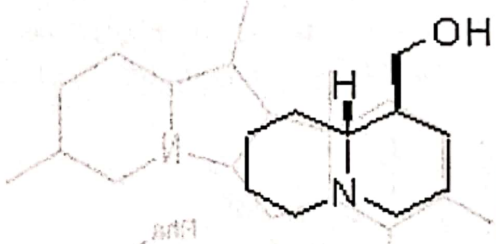
Alcaloizii pirolizidinici s-au găsit în miere, căreia îi conferă gustul amar. Cantitatea de toxină este prea mică şi nu produce simptome acute. Efectele sunt cumulative, iar consumul pe termen lung este riscant.

*Symphytum officinale* (tătăneasa) conţine câţiva alcaloizi pirolizidinici care produc ocluzia venelor hepatice, ciroză şi moarte. Omul se intoxică după consumul ceaiurilor medicinale. La şobolan, administrarea orală cronică a *simfitinei* induce neoplazia hepatocelulară. Animalele ierbivore n-o ingeră, datorită perilor aspri.

*Alcaloizii cu nucleu chinolizidinic* se găsesc la plantele din familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionaceae* (*Lupinus, Laburnum vulgare*), dar şi în plantele altor familii.

Consumul unor cantităţi mari de seminţe de *Lupinus*, de către om, are efecte toxice. Toxicitatea variază la diferite specii de *Lupinus* şi produce simptome diferite la animalele domestice. După ingestie, reacţiile animalelor sunt paradoxale: unele animale suferă depresie, iar la altele semnele excitaţiei sunt evidente. Bovinele nu par să fie afectate, dar laptele devine toxic. Pericolul intoxicării umane provine din faptul că păstăile de lupin sunt asemănătoare celor de fasole şi de mazăre.

Din plantele de *Lupinus* s-au izolat numeroşi *alcaloizi*, majoritatea având ciclu quinolizidinic şi piperidinic. Alcaloidul dominant, cu proprietăţi toxice, este *lupinina*, alături de numeroşi inhibitori enzimatici. Alcaloizii sunt mai concentraţi în ţesuturile plantei după înflorire, deoarece se acumulează în seminţe şi rămân toxici după uscarea plantei.



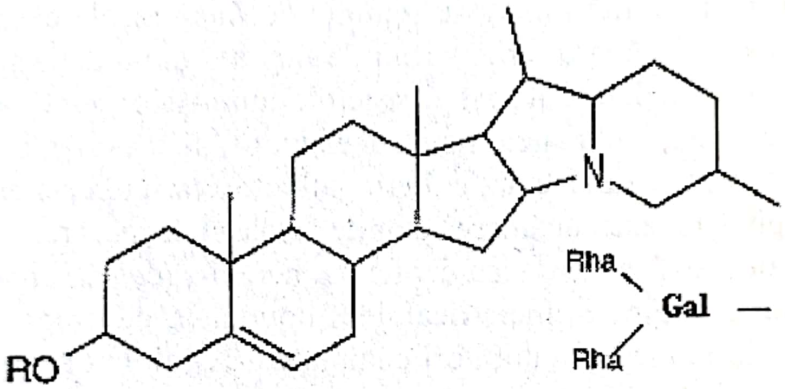

Lupinina

Intoxicaţia gravă cu *Lupinus* pare a fi produsă de micotoxinele sintetizate de ciuperca *Phomopsis leptostomiformis*, care contaminează plantele. Examenul histologic relevă necroză hepatocelulară centrolobulară, hiperplazia celulelor Kuppfer şi a canaliculelor biliare, necroză hepatică şi ciroză.

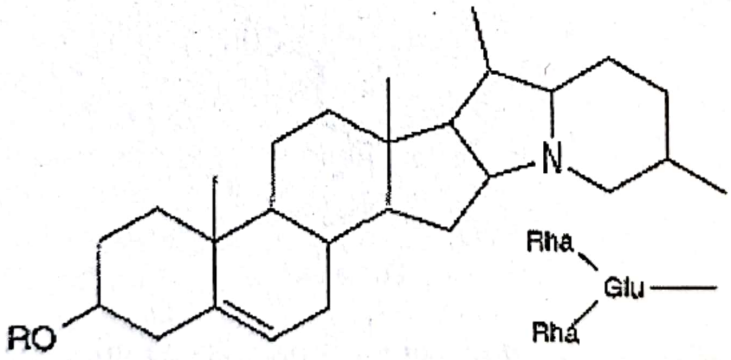
*Alcaloizii steroidici* au un inel dublu de C cu un atom de N, legat de un ciclu steroidic alcătuit din 4 inele de C. Se găsesc în cartof (*Solanum tuberosum*), pătlăgea (*Solanum lycopersicum*) etc. şi deoarece conţin resturi glucidice, aparţin familiei *glicoalcaloizilor*. Gruparea agliconică este o moleculă cu 27 atomi de C şi unul de N, cu structură *steroidică*. Toate glicozidele izolate şi caracterizate chimic conţin molecula de bază a colesterolului, cu o grupare OH în poziţia 3.

Scanned with OKEN Scanner

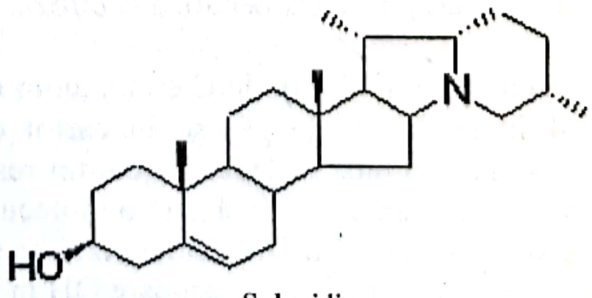
*Solanum tuberosum* (cartoful) conţine un amestec de *glicoalcaloizi* toxici, în toate organele plantei, dar în cantităţi nesemnificative în tuberculi. În prezenţa luminii, celulele din tegumentul tuberculilor fac fotosinteză şi cantitatea de alcaloizi creşte. Sinteza glicoalcaloizilor toxici este simultană cu procesul fotosintetizant. Învelişul tuberculului, plantele tinere şi mugurii de cartof conţin cantităţi toxice ale glicoalcaloizilor *solanină şi chaconină*, a căror grupare glucidică este un *trizaharid* (glucoză, galactoză, ramnoză, respectiv glucoză, ramnoză, ramnoză), iar agliconul este *solanidina*. Fructul (bacă) conţine glicoalcaloizi de 10–20 de ori mai concentraţi decât în tuberculi. *Solanina* şi *chaconina* nu sunt inactivate prin prelucrare obişnuită. Niveluri de peste 20 mg glicoalcaloizi/100 g sunt nesigure pentru consum. Efectele majore ale intoxicaţiei sunt iritarea tractului gastrointestinal şi disfuncţii ale sistemului nervos.




Chaconina




Solanina

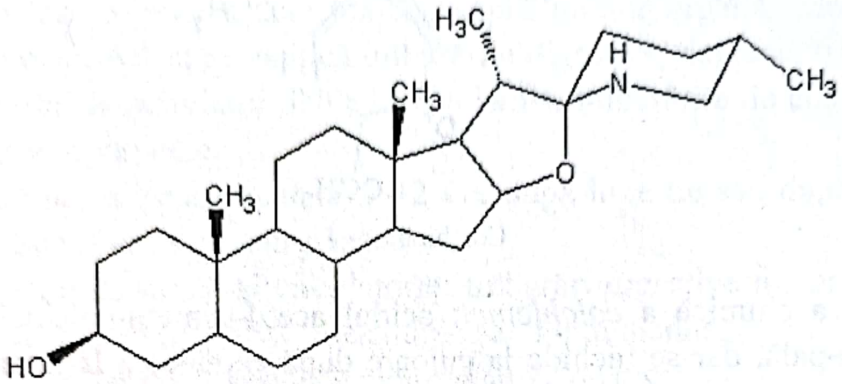



Solanidina

Scanned with OKEN Scanner

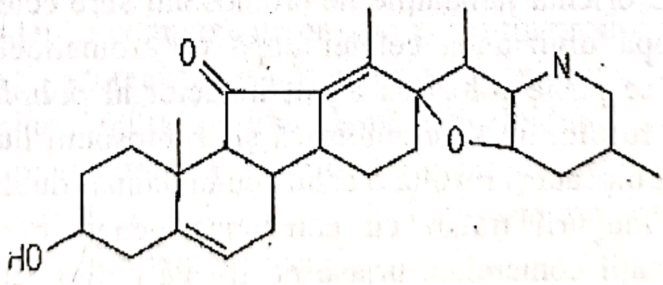
Unii alcaloizi steroidici sunt foarte toxici şi produc gastroenterita severă, care poate fi fatală. Multe specii de *Solanum* sunt toxice pentru om, dacă sunt consumate în stare crudă. Chiar cartoful e toxic, dacă este verde după expunerea la soare. Fructele cartofului sunt totdeauna toxice.

*Tomatina* este glicozidul din frunzele de *Solanum lycopersicum*. Prin hidroliză rezultă două molecule de glucoză, una de galactoză şi una de xiloză. Agliconul este *tomatidina*.




Tomatidina

*Veratrum viridae* (familia *Liliaceae*) este o plantă perenă, ce conţine *alcaloizi steroidici*, cu efecte teratogene evidenţiate în studii experimentale pe animale de laborator. Intoxicaţia bovinelor, ovinelor şi păsărilor domestice survine după consumul plantelor tinere. Alcaloizii *steroidici*, cel mai important fiind *jervina*, ale cărui efecte teratogene s-au demonstrat, se găsesc în toate organele plantei. Bovinele ingeră rareori planta: produce scăderea ritmului cardiac şi a presiunii arteriale. *Germidina* este un alcaloid studiat ca posibil medicament antihipertensiv.



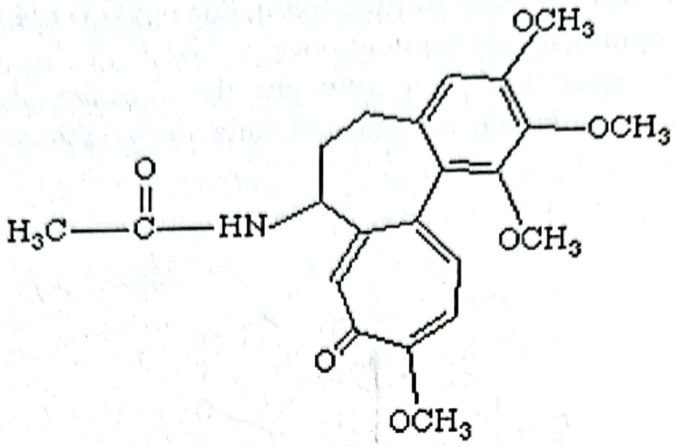

Jervina

Alcaloizii steroidici produşi de broaştele din genurile *Dendrobates* (pumiliotoxina) şi *Phyllobates* (batrachotoxina) sunt prezentaţi în alt capitol al acestei lucrări.

*Helleborus* (spânzul), *Colchicum, Tulipa, Narcissus jonquilla* conţin *alcaloizi* toxici, iar *Aloe, Scilla, Convallaria majalis* conţin glicozide toxice. Concentraţiile cele mai mari se găsesc în rădăcinile subterane denumite *bulbi* sau *rizomi*. Toate au utilizări farmacologice, dar periclitează viaţa dacă se ingeră în cantitate mare.

Scanned with OKEN Scanner

*Colchicina.* Alcaloizii din *Helleborus* şi *Colchicum* scad presiunea arterială şi diminuă ritmul cardiac.



Colchicina

Denumirea chimică a *colchicinei*: acidul acetil-trimetil-colchicinic. Este o pulbere galben-pală, dar se închide la culoare după expunerea la lumină. Este un *alcaloid aminic* cu 3 inele, extras din *Colchicum autumnale*, solubil în apă, alcool şi cloroform şi puţin solubil în eter.

Colchicina este toxică şi chiar carcinogenă. Doza de 7–60 mg este mortală. Simptomele apar în 4 ore, iar moartea survine în 4 zile.

Colchicina este un agent *antimitotic* ce blochează sau supresează diviziunea celulară prin stoparea mitozei, adică blochează diviziunea nucleului. Distribuţia cromosomilor în celulele rezultate din diviziune este dependentă de formarea fusului de diviziune. Fusul se formează prin polimerizarea *tubulinei* dintr-o masă de subunităţi, într-o fază specifică a ciclului, după care se depolimerizează. Fibrele fusului au rolul de a orienta jumătăţile de cromosomi spre cele două celule fiice. Deoarece poate stopa diviziunea celulei după ce cromatidele s-au separat în anafază, colchicina se poate folosi ca agent inductor al *poliploidiei*: în prezenţa alcaloidului, fibrele fusului nu se asamblează şi cromosomii nu se distribuie spre poli. Diviziunea este blocată şi rezultă o celulă cu un număr dublu de cromosomi.

Seminţele şi mugurii trataţi cu colchicină generează celule poliploide. Poliploidia are aplicaţii comerciale uriaşe pentru că poliploizii impari (3n) sunt sterili şi fără seminţe. Poliploizii 4n produc flori şi frunze mai mari. Multe dintre produsele vegetale comercializate sunt variante poliploide: grâu, bumbac, tutun, cartof, mere.

Colchicina se foloseşte în *tratamentul gutei*. Guta este o maladie inflamatorie a articulaţiilor cauzată de metabolismul defectuos al acidului uric, în care excesul de acid uric este transformat în cristale de urat de sodiu, depozitate ulterior în articulaţiile mari, producând inflamaţie şi senzaţia de durere. Cristalele de uraţi sunt ingerate de neutrofile, ceea ce duce la fenomenul de activare celulară, urmat

Scanned with OKEN Scanner

de eliberarea enzimelor şi distrugerea litică a celulelor tisulare. Nu se cunoaşte mecanismul de acţiune, dar tratamentul pare să reducă frecvenţa atacurilor severe: colchicina ar putea acţiona prin inhibiţia fagocitozei şi a eliberării factorilor chimiotactici, prin inhibiţia răspunsului neutrofilelor (inhibiţia mişcărilor amoeboidale).

Intoxicaţia cu colchicină se aseamănă cu cea arsenică: simptomele sunt arsuri ale cavităţii bucale şi gâtului, tulburări digestive, vomă, insuficienţă renală.

Colchicina exercită efecte toxice asupra multor organe, care se datorează inhibiţiei mitozei. Astfel se explică tulburările digestive, depresia funcţiei măduvei osoase, perturbarea activităţii SNC, hipovolemia, tulburările de coagulare care pot duce la moarte şi alopecie.

Manifestările toxice apar la 2–12 ore după ingestie sau după administrarea parenterală. Simptomele parcurg 3 stadii:

– faza gastrointestinală şi circulatorie: tulburări digestive majore, excitaţia sau depresia activităţii SNC, deshidratare, hipovolemie, hipoventilaţie. Şocul cardiovascular poate produce moartea în 72 de ore;
– faza aplaziei medulare (intervalul 3–10 zile), cu agranulocitoză: dezordini de coagulare cu hemoragie difuză, miopatie, paralizie ascendentă, insuficienţă renală acută;
– faza de recuperare, după 10 zile.

Intoxicaţia cu *Colchicum autumnale* este rară şi survine în următoarele circumstanţe:

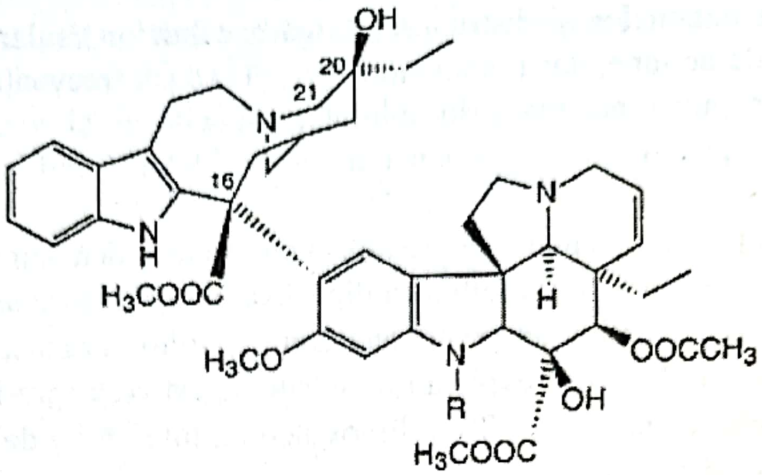
– ingestia accidentală a seminţelor de către copii;
– ingestia frunzelor ca „salată";
– ingestia bulbilor, care sunt confundaţi cu cei de ceapă;
– ingestia voluntară a componentelor plantei pentru producerea avortului.

Intoxicaţia se datorează absorbţiei principiului toxic din tractul gastrointestinal. Ficatul reţine o proporţie importantă a alcaloidului. Colchicina se leagă cu albumina şi este transportată la ţesuturi. Se acumulează în rinichi, ficat, splină, peretele gastrointestinal şi în leucocite. În organism nu este metabolizată (este excretată în formă chimică nemodificată).

Colchicina este transportată în celulă şi se leagă de tubulină, împiedicând polimerizarea ei în microtubuli. Legarea este reversibilă, cu timpul de înjumătăţire al complexului colchicină-tubulină de 36 de ore.

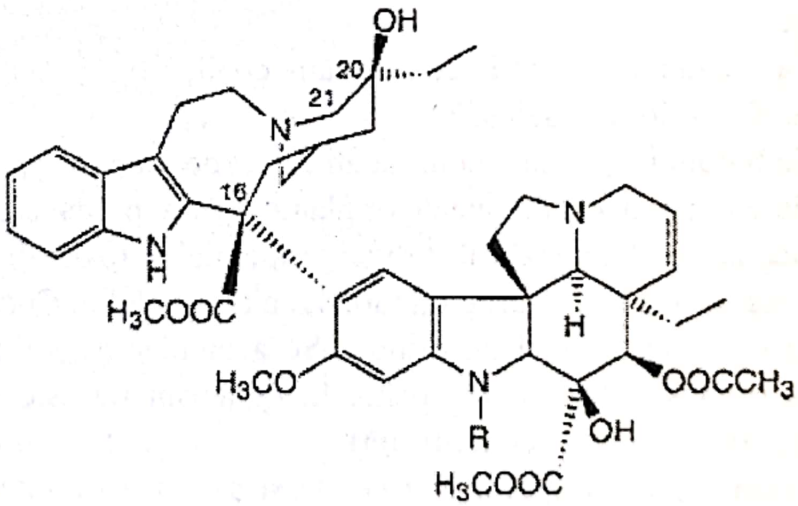
În ramurile tinere de *Catharanthus roseus* (familia *Apocynaceae*) – o plantă anuală – se găseşte un *alcaloid* din care s-a obţinut *vinblastina* şi *vincristina*. A fost prima plantă (1958) folosită în tratarea şi vindecarea unor tipuri de neoplazii: boala Hodgkin (malignitate a ganglionilor limfatici şi splinei) şi leucemia acută a copiilor.

Scanned with OKEN Scanner




Vinblastina (R= -$CH_3$)

*Vinblastina* se administrează la o doză de 6 mg/$m^2$ de suprafaţă corporală. Are un timp de înjumătăţire în sânge de 24 de ore. Se foloseşte pentru tratamentul bolii Hodgkin, limfomului, neoplaziei testiculare avansate, carcinomului de sân, sarcomului Kaposi. Se pare că interferă cu metabolismul acidului glutamic (căile care leagă acidul glutamic cu ciclul Krebs şi cu formarea ureii). Nu se administrează persoanelor care au focare infecţioase bacteriene şi nici gravidelor, deoarece este teratogen. Efectele secundare sunt pierderea părului, stare de rău, leucopenie, dureri de cap, durere abdominală, constipaţie. Efectele toxice asupra măduvei osoase limitează doza tolerată.




Vincristina (R= -CHO)

*Vincristina* are o perioadă de înjumătăţire în ser, de 85 de ore. Se foloseşte pentru tratarea leucemiei, neuroblastomului, boala Hodgkin şi altor limfoame. Doza este de 1,4 mg/$m^2$ de suprafaţă corporală. Factorul limitant al dozei este *neurotoxicitatea* (lezează sistemul nervos periferic). Nu se administrează gravidelor deoarece produce efecte teratogene.

Scanned with OKEN Scanner

Vinblastina şi vincristina sunt substanţe inhibitorii ale asamblării fusului de diviziune: produc depolimerizarea microtubulilor din care se asamblează structura fusului, ceea ce stopează eficient diviziunea celulelor care se divid şi determină remisia malignităţii. Datorită utilizării acestor alcaloizi, şansa de supravieţuire a pacienţilor cu boala Hodgkin a crescut la 90%.

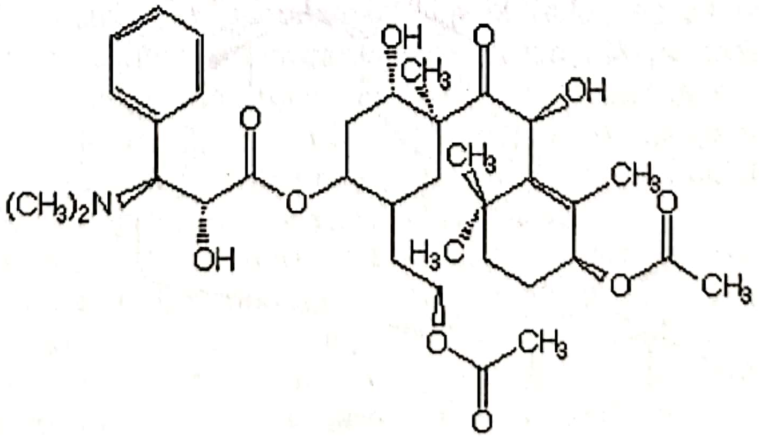
*Tulipa* (familia *Liliaceae*) şi *Narcissus jonquilla* conţin alcaloizi toxici asemănători colchicinei, care produc tulburări nervoase şi digestive: stare de rău general, dureri abdominale, vertij, rareori convulsii şi moarte.

*Tulipa gesneriana* conţine *tulipozida A*, un alcaloid alergenic, care produce dermatita de contact la persoanele sensibile. Alergenul are cea mai mare concentraţie în bulbi, mai puţin în tulpini şi frunze şi cel mai puţin în flori. Tulipozida A este precursorul agentului sensibilizant denumit *α-metilen-γ-butirolactona*, care rezultă din hidroliza tulipozidei A şi lactonizarea* agliconului. Acest compus produce dermatita la persoanele sensibile. Intoxicaţia omului este rară şi survine după ce bulbii sunt consumaţi, fiind confundaţi cu bulbii de ceapă: vomă, salivaţie abundentă, transpiraţie, dificultăţi respiratorii, palpitaţii.

*Lactonele sunt esteri intramoleculari.

Seminţele şi frunzele de tisă (*Taxus baccata*) conţin un amestec de *alcaloizi* foarte toxici care inhibă activitatea cardiacă. Pulpa fructului (bacă de culoare roşie) de *Taxus baccata* nu este toxică, dar seminţele pot cauza intoxicaţia mortală. Uneori, moartea survine brusc, fără alte simptome. Numai plantele de sex feminin poartă fructe.

Toate organele plantei sunt toxice, cu excepţia părţii cărnoase a fructului (bacă). Cel mai important alcaloid este *taxina*, ale cărei efecte toxice sunt foarte puternice, la care se adaugă alcaloizi secundari şi glicozidul *taxicatina*. Frunzele conţin cea mai mare concentraţie de taxină în sezonul de iarnă (2%), iar cea mică (0,5% din greutatea uscată), în sezonul cald. Seminţele conţin circa 1% taxină, din greutatea uscată. Decoctul din 50–100 g de frunze sau din 30 de fructe reprezintă doza mortală pentru adult.




Taxina

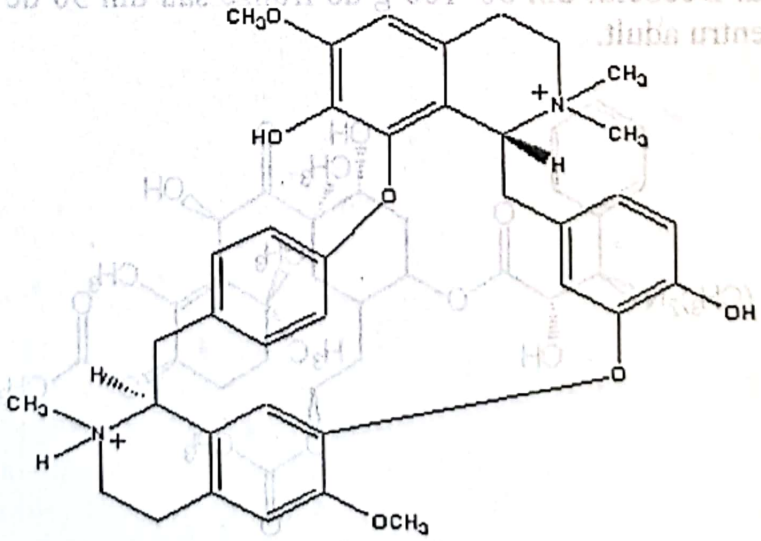
Acţiunea taxinei este foarte rapidă, deoarece în sistemul digestiv se absoarbe rapid. Este o substanţă foarte toxică pentru sistemul cardiovascular: produce tulburări digestive, midriază, paloare, pierderea cunoştinţei şi moarte prin stop cardiac şi mai rar prin insuficienţă respiratorie. Toxina acţionează ca depresor al activităţii cardiace.

Tratamentul constă în spălări gastrice cu soluţie slabă de acid tanic, urmată de administrarea suspensiei de cărbune activ şi a medicaţiei stimulatoare cardiace.

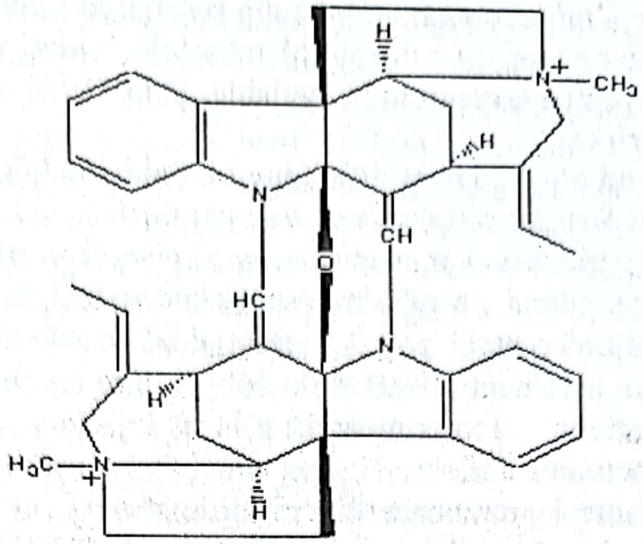
Calul este cel mai sensibil şi moartea poate să survină în câteva minute după hrănirea cu ramuri tinere. Doza letală pentru cal este de 100–200 g de frunze. Bovinele sunt mai rezistente: doza mortală este de 5 ori mai mare. În sezonul rece, frunzele conţin o cantitate mult mai mare de toxină, decât în sezonul cald. Diferenţa poate fi interpretată ca o adaptare la mediu: copacul se protejează prin creşterea cantităţii de alcaloid toxic, iarna, când poate fi singura plantă verde.

*Actaea spicata, Clematis, Delphinium consolida* (nemţişori), *Caltha palustris, Aconitum napellus* (omag) conţin într-o proporţie foarte mare, substanţe cu un potenţial toxic înalt din categoria *alcaloizilor*. Sucul, florile, seminţele şi frunzele sunt toxice. Plantele viguroase conţin o cantitate mai mare de compuşi toxici, iar în stare uscată, în general sunt fără pericol. Ingestia accidentală a acestor plante sau abuzul de produse farmaceutice obţinute din plante periclitează viaţa. Alcaloizii produc senzaţia de arsură a tubului digestiv, starea de confuzie, ameţeli, dureri de cap şi vomă. În cazurile grave, apar dificultăţi respiratorii, paralizie, convulsii şi moarte prin asfixie şi insuficienţă circulatorie.

*Curara* este un *alcaloid* produs de planta *Strychnos toxifera*, din a cărei scoarţă se extrage, dar şi de alte specii ale acestui gen. Triburile din Guiana britanică, Guiana franceză, Venezuela şi Brazilia de nord o folosesc ca „otravă de săgeată". Modul de preparare nu este cunoscut, dar probabil se face o infuzie sau un decoct, care se evaporă până la o consistenţă adecvată. Curara conţine un amestec de alcaloizi toxici: *curarina* ($C_{19}H_{26}N_2O$), *curina* ($C_{18}H_{19}NO_3$), *tubocurarina* etc. În amestecul heterogen, cei mai obişnuiţi alcaloizi sunt *curarina* şi *tubocurarina*.




d-tubocurarina



C-curarina

Curara are gust amar şi este solubilă în apă.

Curara produce efecte toxice numai după ce pătrunde în circulaţie, pe calea unei leziuni tegumentare, prin injecţie sau după ce este inhalată. Aplicarea tegumentară este iritantă. Curara este aproape inertă după ingestie, probabil datorită acţiunii inactivatoare a sucului gastric şi excreţiei rapide.

Substanţele chimice principale ale curarei sunt *alcaloizii* care modifică propagarea impulsurilor nervoase la nivelul plăcii neuromusculare. Acţiunea curarei este selectivă, toxina fiind activă asupra sinapselor colinergice: *tubocurarina*, componenta activă a curarei, *se leagă specific cu receptorii de acetilcolină* ai joncţiunii neuromusculare şi blochează transmiterea potenţialului de acţiune.

Efectul principal al *curarei* este paralizia muşchilor striaţi: produce slăbirea controlului, relaxarea sau paralizia muşchilor scheletici prin interferenţa cu transmiterea impulsurilor nervoase între terminaţia axonală şi aparatul fibrilar contractil al celulei musculare. Alcaloidul interferă cu acţiunea acetilcolinei, care constă în depolarizarea sinapsei neuromusculare şi blochează joncţiunea neuromusculară. În doze mai mari, efectul paralizant se extinde asupra celulei nervoase. Paralizia muşchilor striaţi se generalizează şi se extinde asupra muşchilor netezi.

Victima intoxicaţiei cu curara rămâne conştientă pe măsură ce paralizia progresează, până atinge muşchii respiratori, când moartea survine prin blocaj respirator. Dacă i se face respiraţie artificială, victima este recuperată.

Activitatea cardiacă nu este afectată de curara. La animalele otrăvite, inima continuă să pulseze după oprirea mişcărilor respiratorii.

Curara se foloseşte în tratamentul unor afecţiuni spasmodice: epilepsie, chorea, poliomielită, hidrofobia (rabia) şi mai ales tetanos. Soluţia apoasă se injectează subcutan. Se administrează pacienţilor care trebuie menţinuţi imobilizaţi total în timpul operaţiilor chirurgicale. Curara se injectează hipodermic în tratamentul tetanosului, rabiei şi intoxicaţiei cu stricnină, în doze mai mici decât cele care produc paralizia motorie.

Scanned with OKEN Scanner

Alcaloidul pur – *tubocurarina* – izolat din scoarţa de *Chondodendron tomentosum* s-a folosit în anestezie, ca relaxant al muşchilor striaţi şi cardiac în timpul actului chirurgical, pentru a controla convulsiile. După 1950 s-au obţinut analogii sintetici ai tubocurarinei.

Curarina este un alcaloid care diferă mult de alţi alcaloizi (stricnina) produşi de specii ale genului *Strychnos* (*Strychnos nux-vomica*).

S-a afirmat că stricnina şi principiul activ al curarei se neutralizează reciproc. Experienţele pe câine, căruia i s-au administrat concomitent doze mari ale ambelor substanţe toxice, confirmă această ipoteză. Aceeaşi doză de stricnină produce moartea.

*In vitro*, curara este neutralizată de o soluţie care conţine o parte iod, două părţi KI şi 48 părţi apă. Experimental, soluţia injectată subcutan are efecte protectoare faţă de acţiunea curarei.

O serie de plante leguminoase din genurile *Astragalus* şi *Oxytropis* conţin substanţe care pot produce leziuni grave şi permanente ale SNC. Anumite componente ale acestor plante determină un comportament anormal, în special al bovinelor, cunoscut sub denumirea de *locoism**.

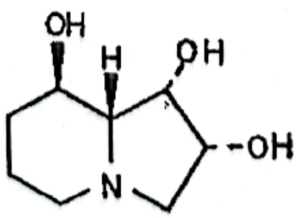
* Denumirea de „locoism" vine de la cuvântul spaniol *loco*=nebun, care desemnează comportamentul anormal al animalelor intoxicate.

Alterarea comportamentului este rezultatul leziunilor neurologice. Cea mai mare parte a timpului, animalele sunt depresate şi letargice. Întreruperea consumului limitează efectele toxice, dar leziunile neurologice pot fi permanente. În câteva săptămâni, cele mai multe animale se recuperează şi îşi ameliorează condiţia. Dar simptomele pot să reapară imprevizibil la animalele de tracţiune (în special la cai) şi au o evoluţie defavorabilă. Intoxicaţia cronică a animalelor domestice produce emacierea şi epuizarea, pe măsură ce animalele îşi pierd capacitatea de hrănire. Unele mor prin înfometare, dar majoritatea mor prin accidentare datorită pierderii treptate a coordonării motorii.

Alte pierderi se datorează avortului, malformaţiilor, creşterii riscului morţii neonatale, şi sensibilităţii la agenţii infecţioşi.

Aceste plante, în general, sunt gustoase în stare proaspătă, iar în sezonul rece sunt consumate în absenţa altor surse de hrană.

*Swainsonina. Astragalus* este cel mai cuprinzător gen de plante cu flori (circa 2000 de specii). Plantele acestui gen produc *alcaloizi – indolizidina, swainsonina* şi *N-oxid-swainsonina*, care determină *locoismul*, caracterizat printr-un comportament anormal, agresiv, al cailor şi bovinelor.



Swainsonina

Intoxicaţia se manifestă sub forma pierderii progresive a coordonării motorii şi tendinţa la solitudine. Stadiile finale ale intoxicării se caracterizează prin dificultăţi ale reflexelor somatice ale actului alimentar (masticaţie, deglutiţie), paralizie şi moarte. La altitudini de peste 2120 m, cornutele suferă de insuficienţă cardiacă congestivă, deoarece swainsonina influenţează sistemul vascular.

Mecanismul producerii intoxicaţiei celulei nervoase este complex şi puţin cunoscut. Alcaloizii de tipul swainsoninei *inhibă enzima* esenţială – *α-manozidaza,* iar hidroliza glucidului (manoza) este stopată. Rezultatul este acumularea *manozei* în celula nervoasă şi producerea unor leziuni funcţionale ireversibile ale ţesutului cerebral. Neuronii sunt cei mai sensibili la acumularea manozei. Starea patologică a animalelor intoxicate se aseamănă foarte mult cu maladia umană denumită *manozidoză*, datorată unei deficienţe genetice. Manozidoza este o maladie de depozitare lizosomală (tezaurismoză), care determină umplerea neuronilor SNC cu incluzii de manoză. Incluziile sunt lizosomi cu volum crescut prin acumularea glucidului, datorită absenţei manozidazei, enzima esenţială pentru degradarea manozei. Efectele stărilor de intoxicaţie cu buruieni asupra neuronilor sunt parţial asemănătoare cu maladiile de depozit.

Cea mai cunoscută tezaurismoză este maladia Tay Sachs. În absenţa enzimei vitale HEX A (*hexozaminidază A*), necesară degradării gangliozidelor, în celulele nervoase se acumulează şi se depozitează un lipid – gangliozidul $GM_2$.

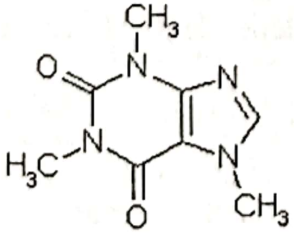
Studiul intoxicaţiei cu buruieni asupra SNC al bovinelor poate avea ca rezultat o mai bună înţelegere a maladiilor neuronale umane cu substrat genetic, al căror sfârşit este totdeauna letal.

Efectul swainsoninei asupra α-manozidazei este reversibil, dacă planta nu mai este ingerată. Semnele clinice avansate sunt ireversibile, datorită degenerării axonale.

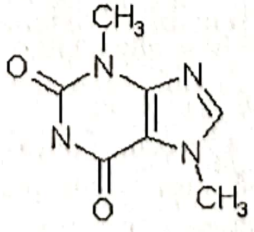
S-a demonstrat că speciile endofite ale fungilor filamentoşi din genul *Alternaria* sunt asociate cu speciile de plante care produc intoxicaţiile neurodegenerative. Culturile celulare din plante, făcute cu scopul de a detecta infecţia endofitică a plantelor toxice şi netoxice au evidenţiat că rata de infecţie a plantelor toxice este de 69%, iar a celor netoxice este 0. Toxicitatea plantelor pare a fi strâns legată de infecţia endofitică.

*Alcaloizii purinici* au un inel dublu de C cu 4 atomi de N. Au o structură moleculară foarte asemănătoare cu a bazelor purinice azotate ale acizilor nucleici. Cei mai importanţi sunt *cafeina* şi *teobromina*, cu efecte stimulatoare medii asupra activităţii sistemului nervos. Cafeina se găseşte în *Coffea arabica, Camellia sinensis* şi *Cola nitida.*

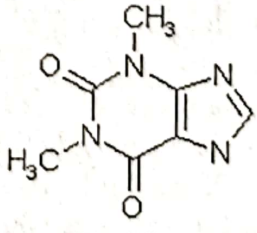
Seminţele de cacao (*Theobroma cacao*) sunt sursa primară de teobromină.



Cafeina



Teobromina



Teofilina

Scanned with OKEN Scanner

Cafeina, teobromina şi teofilina nu sunt purine, ci aparţin grupului xantinelor. Xantinele stimulează activitatea sistemului nervos şi pot determina stări de nelinişte şi de insomnie. Cafeina este excretată în urină sub forma metilxantinei şi acidului metiluric.

### *Lectine toxice*

#### *Ricina*

Ricinul (*Ricinus communis* – familia *Euphorbiaceae**) este o plantă comună şi cauzează cele mai frecvente intoxicaţii accidentale. Florile sunt colorate şi atrăgătoare. Toate organele plantei produc un suc care conţine o largă varietate de toxine. Chiar după uscare, plantele îşi păstrează proprietăţile toxice. Substanţele produse de membrii acestei familii au un potenţial toxic ridicat pentru om. Sunt letale pe orice cale: prin ingestie, injectare sau prin inhalare.

*Ricina* este glicoproteina (lectină) toxică din seminţele de ricin (fig. 46), fiind una dintre cele mai toxice proteine pentru om, animale superioare şi insecte. Denumirea de ricină a fost dată de Stillmark (1888), după ce a evidenţiat efectul hemaglutinant al extractului din seminţe. Ulterior s-a evidenţiat că aglutinarea hematiilor s-a datorat unei lectine cu care este asociată ricina – *aglutinina*, de 120 kDa. Ricina este o *citotoxină* puternică, dar este slab hemaglutinantă, iar aglutinina este o citotoxină slabă dar este o *hemaglutinină* puternică. Ricina şi aglutinina formează 5% din conţinutul uscat al seminţelor.

* În medicina veche plantele acestei familii erau cunoscute pentru proprietăţile lor purgatorii şi emetice. Denumirea vine de la numele unui medic antic, Euphorbos. El prescria un emetic pentru toate bolile, în toate situaţiile. Tratamentul era, adeseori, mai nociv decât maladia. Sucul acestor plante conţine uleiuri volatile, răşini, alcaloizi şi glicozide, cu o concentraţie mare de substanţe toxice. Toate părţile plantei care conţin suc, sunt toxice. Planta uscată îşi păstrează proprietăţile toxice. Copiii şi adulţii, uneori confundă capsulele cu seminţe, care se aseamănă cu fructele comestibile ale altor plante. Altă cauză a intoxicaţiei este abuzul consumului de plante cu proprietăţi farmaceutice. La majoritatea speciilor, sucul are un gust amar, astfel că puţine specii de animale le consumă în cantitate suficientă pentru a se intoxica. Consumul euforbiaceelor produce stare de rău general, vomă, diaree. În cantităţi mari, produc senzaţia de arsură a tubului digestiv (gură, gât, esofag, stomac), salivaţie abundentă, convulsii, iar uneori coma şi moartea. Unele produc iritaţii cutanate.

Toxicitatea ricinei este de circa 1000 de ori mai mică decât a toxinei botulinice. Sensibilitatea diferitelor specii este variabilă. S-a determinat o variaţie de 100 de ori a toxicităţii letale a ricinei pentru diferite animale domestice şi de laborator/kg de greutate corporală. Puiul de găină şi broasca sunt cele mai puţin sensibile, iar calul este cel mai sensibil. Toxicitatea este dependentă de calea de administrare:

- la şoarecele de laborator, $DL_{50}$ este de 3–5 µg/kg la 60 de ore după inhalare;
- de 5 µg/kg la 90 de ore după injectare intravenoasă;
- 22 µg/kg la 100 de ore după injecţia intraperitoneală;
- 24 µg/kg la 100 de ore după injectare subcutanată;

Scanned with OKEN Scanner

– 20 mg/kg la 85 de ore după administrare intragastrică. Slaba toxicitate după administrarea orală (de circa 1000 de ori mai mică decât după administrare parenterală) reflectă absorbţia limitată a toxinei din tractul gastrointestinal. Toxicitatea superioară pe celelalte căi de administrare poate fi legată direct de accesibilitatea toxinei la populaţiile de celule sensibile şi de prezenţa receptorilor de toxină pe diferite categorii de celule.

Datorită stabilităţii sale termice şi disponibilităţii unor cantităţi mari pe tot globul, toxina poate fi folosită ca armă biologică*, ceea ce a stimulat studiul proprietăţilor toxice.

* În 1978 dizidentul bulgar G. Markov a fost asasinat la Londra, fiind înţepat cu un ac din vârful umbrelei, trecut prin ricină.

Administrarea repetată a dozelor mici de ricină concomitent cu furajele a indus starea de protecţie imună.

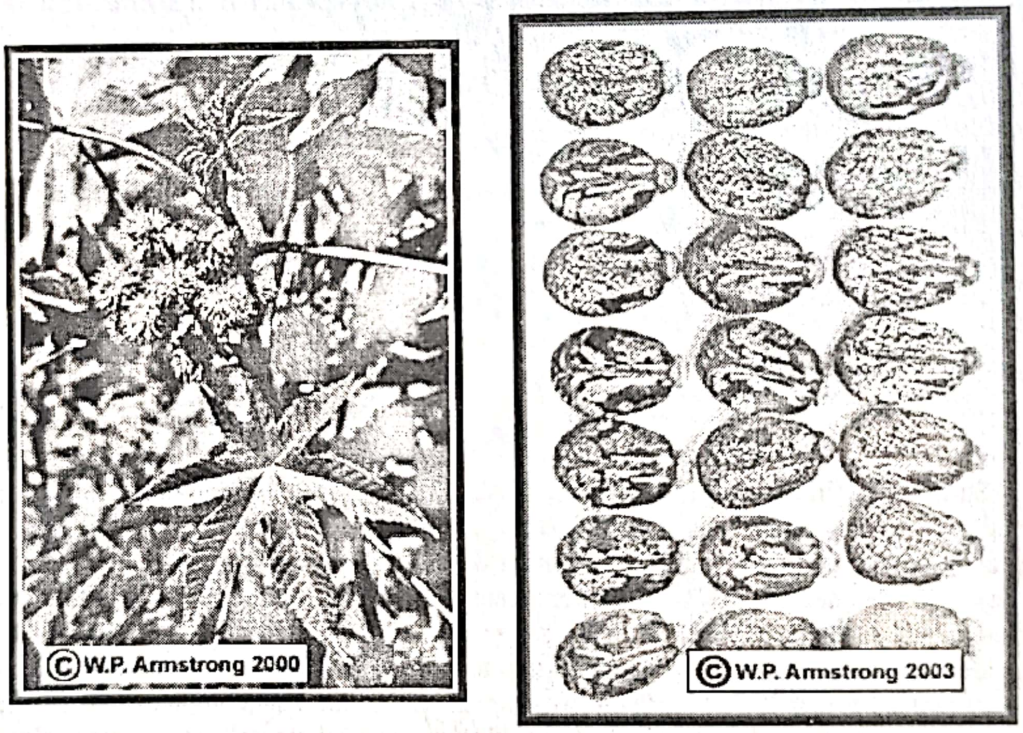



Fig. 46 – Frunza, fructul şi seminţe de *Ricinus communis*.

*Structura.* Ricina este o proteină globulară de 66 kDa, un heterodimer, fiind formată din două catene polipeptidice: o catenă A de 267 aminoacizi (32 kDa), cu activitate enzimatică ce inactivează catalitic subunitatea 60 S a ribosomului şi catena B (32–34 kDa) – (fig. 47). Cele două catene sunt legate printr-o punte S-S. Catena B este o lectină de 262 aminoacizi şi are un situs de legare pentru *gal* la fiecare capăt. Ambele catene sunt glicoproteine care conţin *manoză*. Cele două catene formează legături de H cu glucidele specifice ale membranei (galactoză sau N-acetil-galactozamină). Pentru producerea efectului toxic este necesară asocierea celor două catene. Legătura S-S reuneşte aminoacidul 259 al catenei A cu aminoacidul 4 al

Scanned with OKEN Scanner

catenei B. Catena B are proprietăţi de lectină, care permit moleculei să se lege de galactozidele din glicoproteinele şi glicolipidele suprafeţei celulare.

Fig. 47 – Structura tridimensională a moleculei de ricină, rezultată din studiile de cristalografie cu raze x (Lord et al). Jumătatea din dreapta reprezintă lanţul A, iar în stânga, lanţul B. Catena A (267 aminoacizi) este o proteină globulară, cu 8 secvenţe α-helix şi 8 regiuni β-pliate. Situsul de legare la substrat este marcat de ciclul adeninei. Lanţul B are 262 aminoacizi, cu un situs de legare pentru galactoză la fiecare capăt (ilustrat prin ciclul galactozei). Aceste două situsuri permit formarea legăturilor de H cu glucidele specifice ale membranei (galactoza şi N-acetil-galactozamina). O legătură S-S reuneşte cele două catene. Sferele sunt molecule de apă. Proteinele inactivatoare ale ribosomilor sunt N-glicozilate. Pentru a ajunge în citosol, necesită cea de a doua catenă, o lectină cu specificitate de legare pentru galactoză.

Ricina se sintetizează în celulele endospermului seminţelor care se maturează şi se depozitează în corpul proteic (un compartiment vacuolar). O dată cu germinarea seminţei, toxina este inactivată prin hidroliză în câteva zile.

Ricina se sintetizează ca un *prepropolipeptid*, ce conţine cele două catene A şi B şi se activează după clivajul proteolitic sub acţiunea unei endopeptidaze în corpul proteic. Aceasta clivează polipeptidul în catenele A şi B, care rămân legate prin punţi S-S. Sinteza moleculei sub forma unui precursor atoxic, elimină riscul intoxicării ribosomilor proprii în cazul în care proricina trece accidental în citosol în timpul sintezei şi transportului celular.

Scanned with OKEN Scanner

*Înglobarea.* Catena B are proprietăţi de lectină şi se leagă de glicoproteinele şi glicolipidele suprafeţei celulare ce se termină cu *gal*. Pe suprafaţa unei celule se pot fixa 106–108 molecule de ricină.

Ricina este înglobată prin endocitoză în vezicule tapetate cu clatrină sau în vezicule netede (fig. 48). După înglobare, multe molecule de ricină sunt reorientate spre suprafaţă şi sunt eliminate prin exocitoză. Veziculele de endocitoză pot fuziona cu lizosomii, în care ricina este hidrolizată şi inactivată. Acţiunea toxică se produce în cazul în care cele două catene penetrează membrana reţelei transgolgiene şi se eliberează în citosol. Aproape toată cantitatea de toxină care intră în citosol, trece pe calea aparatului Golgi. Perioada de latenţă de 1–3 ore *in vitro* şi de 8–24 de ore *în vivo*, înaintea morţii celulare şi respectiv a apariţiei semnelor clinice, se corelează cu transportul toxinei în celulă. În citoplasma celulei eucariote, catena A are acţiune *enzimatică* asupra subunităţii ribosomale mari. Tratamentul separat al subunităţilor 40S şi 60S cu catena A a celor două toxine (ricina şi aglutinina), a relevat că ricina inactivează subunitatea 60S, dar nu are efecte demonstrabile asupra subunităţii 40S.

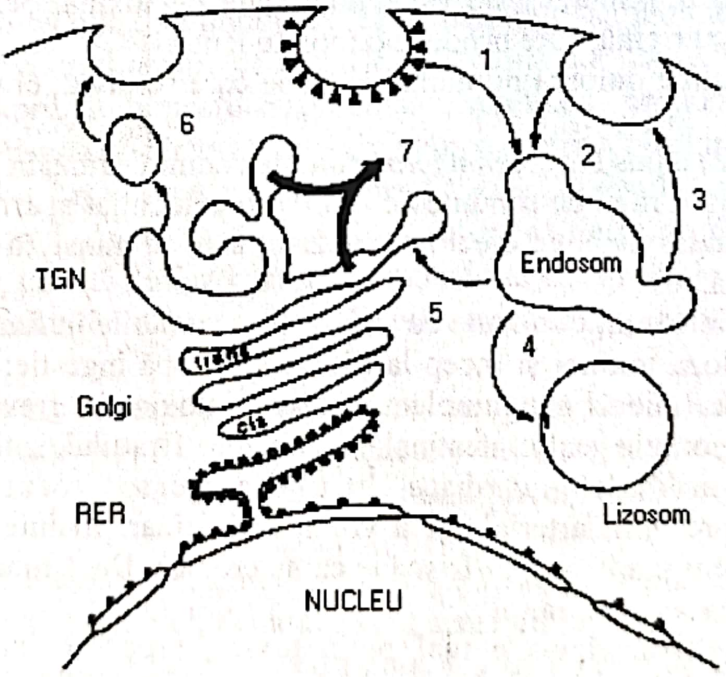



Fig. 48 – Ilustrarea schematică a mecanismului celular al înglobării ricinei.

Intoxicarea prin ingestia seminţelor se datorează ricinei: o cantitate de 1 mg este suficientă pentru a omorî un adult.

Ricina are o constantă Michaelis* (kM) de 0,1 µmol/L pentru ribosomi şi o constantă enzimatică de 1500/min. O singură moleculă de ricină ce pătrunde în citosol poate inactiva peste 1500 ribosomi/min.

* Concentraţia minimă la care o substanţă produce efectele biologice asupra ţintei specifice.

Scanned with OKEN Scanner

Ricina acţionează enzimatic asupra subunităţii 60S a ribosomului: ricina produce depurinarea, adică clivează un rest de *purină,* în special adenina, aproape de capătul 3' al ARNr 28S. Inelul adeninei ARNr rămâne între două inele de tirozină ale cleştelui catalitic al enzimei şi este hidrolizat sub acţiunea sa N-glicozidazică. Adenina ţintă face parte din secvenţa GAGA ce formează o buclă tetranucleotidică. Deleţia face ca factorul 2 de elongaţie a catenei polipeptidice să nu se asocieze polipeptidului nascent şi astfel sinteza proteică este blocată. În absenţa sintezei proteinelor, celulele îşi pierd viabilitatea.

Molecula de toxină inactivează un număr mare de ribosomi, ceea ce argumentează faptul că toxina acţionează prin mecanism *catalitic.*

Toxicitatea ricinei este foarte înaltă: o moleculă/celulă eucariotă este letală. Perioada de lag care precede inhibiţia sintezei proteinelor în celulele *in vitro* este independentă de doza toxinei : chiar pentru dozele mari perioada de lag nu scade sub 20–30 de minute.

Efectul primar al ricinei *in vitro* constă în *inhibiţia sintezei proteinelor.* Ulterior este inhibată sinteza ADN şi ARN.

Ricina inactivează numai ribosomii celulelor eucariote. Ribosomii bacterieni şi mitocondriali sunt rezistenţi. Ribosomii unor plante sunt sensibili.

Membrana citoplasmatică nu este modificată de toxină. Nu există antidot pentru intoxicaţia cu ricină, care produce o moarte lentă.

Cele două toxine omoară nu numai celulele care se divid, ci şi pe cele aflate în faza de repaus.

Ehrlich (1902) a pus bazele *imunotoxicologiei,* administrând în hrana şoarecilor sau iepurilor, cantităţi mici de seminţe de ricin. S-a evidenţiat apariţia în ser a anticorpilor specifici antitoxină, cu efect neutralizant, care se transferă prin placentă şi prin secreţia lactată.

*Simptomele* intoxicaţiei umane cu ricină sunt variabile în funcţie de calea de pătrundere şi de doza toxinei şi încep la câteva ore după ingestie: dureri abdominale, vomă, diaree (uneori sanguinolentă). După intoxicaţia gravă prin ingestie, ricina produce hemoragie gastrointestinală, cu necroza ficatului, splinei, rinichiului, mezenterelor şi miofibrilelor cardiace. În câteva ore se produce deshidratarea severă, scăderea presiunii arteriale şi a volumului urinar. Înainte de şocul fatal, temperatura corpului scade şi apar frisoane caracteristice. Dacă moartea nu survine în 3–5 zile, are loc recuperarea.

Pe cale digestivă, ricina e mai puţin toxică, probabil datorită absorbţiei intestinale limitate şi digestiei enzimatice în tractul digestiv. Celulele Kupffer sunt foarte sensibile datorită receptorului membranar de manoză.

Seminţele intacte, înghiţite, nu produc efecte toxice. O singură sămânţă masticată poate provoca moartea unui copil. Copiii sunt mai sensibili la deshidratare şi efectele sunt mai grave.

Administrarea parenterală la animalele de laborator sau expunerea omului la aerosoli produce congestia căilor respiratorii superioare, creşterea permeabilităţii membranei capilarelor alveolare. Moartea pare a fi cauzată de hipoxemia cauzată de edemul pulmonar masiv şi inundarea alveolelor.

Scanned with OKEN Scanner

Injectarea intramusculară produce durere, necroză musculară locală şi a ganglionilor limfatici regionali. La om, intoxicaţia este asociată cu *leucocitoză* tranzitorie. Numărul leucocitelor creşte de 2–5 ori faţă de valoarea normală.

Moartea survine în a treia săptămână sau mai târziu.

### *Aplicaţii practice ale ricinei*

Ricina nativă este un inhibitor al creşterii neoplazice, iar ulterior s-a folosit pentru producerea agenţilor antitumorali, cunoscuţi sub denumirea de *imunotoxine*. Ricina nativă sau catena A se conjugă cu anticorpi monoclonali (AMC) specifici faţă de celulele tumorale sau cu liganzi care determină legarea componentei active a toxinei de celulele tumorale. Deşi rezultatele au fost iniţial promiţătoare, doi factori limitează eficienţa:

- lipsa specificităţii Ac;
- imunogenitatea semnificativă a jumătăţii toxice, care determină inactivarea şi eliminarea ei sub forma complexelor Ag-Ac.

Ricina se foloseşte pentru *ablaţia* experimentală a unor celule. În acest scop, ADN care codifică o toxină puternică (ca de exemplu, subunitatea A a ricinei) este pus sub controlul unui promotor specific unui ţesut sau unui stadiu de dezvoltare. După ce este exprimat intracelular, produsul genei toxice produce moartea celulei.

Neurologii pot să distrugă selectiv neuronii, prin injectarea ricinei în nervi. Transportul axonal retrograd asigură aportul toxinei la nivelul pericarionului, unde se găsesc ribosomii. Analiza ultrastructurală relevă că ricina produce iniţial dispersia poliribosomilor, urmată de dezorganizarea reticulului endoplasmic granular în vezicule netede. Pericarionul îşi măreşte dimensiunile, nucleul se picnozează şi neuronul se dezintegrează.

Deoarece ricina este o lectină care se leagă de N-acetil galactozamină, moleculele marcate pot fi folosite în amestec cu alte lectine care au specificităţi diferite de legare, pentru a urmări dinamica glicozilării proteinelor membranei neuronale.

Transportul suicid al ricinei se foloseşte în studiile asupra neuronilor maturi motori şi senzitivi periferici, deoarece sunt sensibili la ricină. Neuronii din SNC al adultului sunt rezistenţi la ablaţia cu ricina. Creierul organismelor aflate în cursul dezvoltării este sensibil, ceea ce sugerează că odată cu maturarea neuronilor, se produc modificări cantitative ale glicozilării, prin clivarea sau mascarea resturilor de galactoză odată cu adăugarea resturilor de acid sialic.

Transportul suicid este utilizat în clinică pentru eradicarea infecţiilor latente cu virus herpetic în neuronii senzitivi trigeminali şi pentru tratamentul neuroamelor la equine. În experienţele de transport suicid, adeseori o parte a toxinei injectată iese din nerv şi produce intoxicarea sistemică a organismului. Efectele toxice pot fi prevenite prin administrarea simultană a antiserului specific.

Scanned with OKEN Scanner

Introducerea şi expresia unei gene codificatoare a unei substanţe toxice în animalele transgenice sau în plante poate duce la ablaţia unui anumit tip de celule, care poate fi folosită pentru studiul dezvoltării diferitelor linii celulare şi pentru generarea modelelor animale ale bolilor degenerative.

*Abrina* este o *lectină toxică* din seminţele de *Abrus precatorius* (fig. 49) (familia *Fabaceae*). Toxicitatea şi mecanismele de înglobare şi de acţiune sunt asemănătoare cu acelea ale ricinei. Efectele toxice se produc asupra majorităţii speciilor animale.

Singura componentă toxică a plantei este sămânţa. O singură sămânţă masticată poate fi fatală. Abrina este termolabilă. Prin încălzire, molecula se denaturează şi îşi pierde toxicitatea.

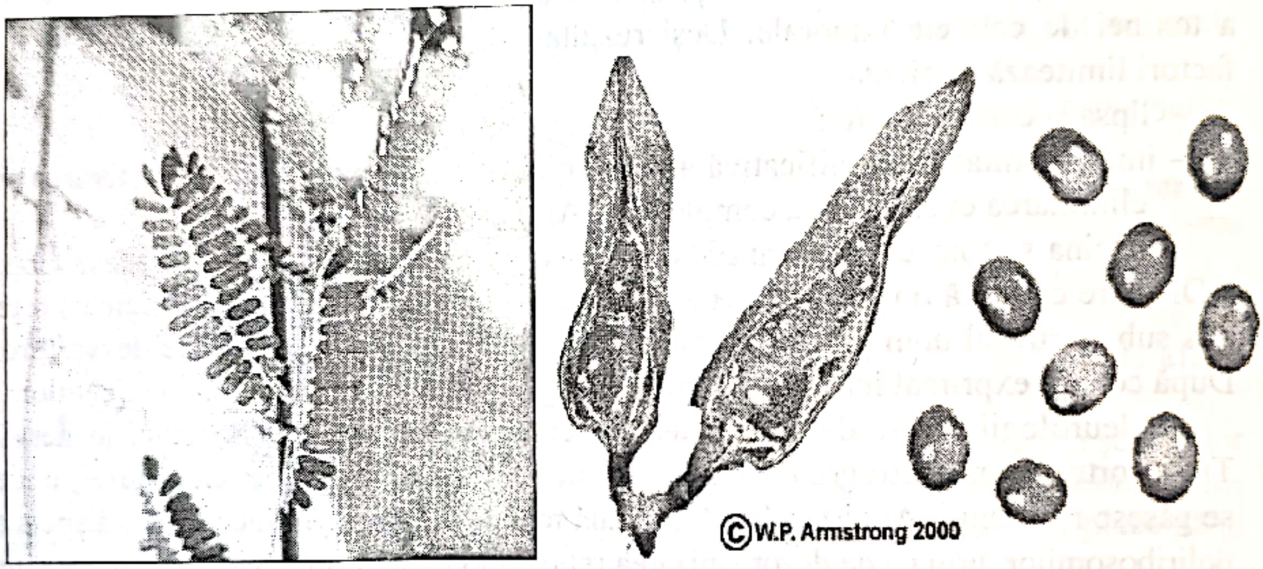



Fig. 49 – Frunze, păstăi şi seminţe de *Abrus precatorius*.

Abrina, o lectină, este inactivatoare a ribosomilor. În ţesutul limfoid, induce moartea apoptotică a limfocitelor. Este una dintre cele mai puternice toxine cunoscute. Kingsbury (1985) a stabilit că doza toxică pentru om este de circa 0,00015% din greutatea corporală a subiectului.

## Alte molecule potenţial toxice din seminţele de leguminoase

Familia *Leguminosae* (*Fabaceae*) cuprinde câteva plante de mare importanţă economică alimentară sau furajeră: fasolea de soia (*Glycine max*), bobul (*Vicia faba*), mazărea (*Pisum sativum*), năutul (*Cicer arietinum*), lucerna, trifoiul, măzărichea. Seminţele, păstăile şi frunzele tinere ale tuturor plantelor menţionate au o toxicitate variabilă în funcţie de specie, de organul plantei, de sezon.

Seminţele de *Lathyrus sativa* conţin *aminoacizi neproteici* care produc modificări ale activităţii SNC cunoscute sub denumirea de *neurolatirism*: rigiditate şi paralizie musculară sau chiar moarte.

Scanned with OKEN Scanner

*Neurolatirismul* este o stare neuropatologică ce apare la persoanele care consumă seminţe de *Lathyrus sativa* ca principală sursă de energie pentru o perioadă de 2–3 luni. Maladia se caracterizează prin rigiditate musculară şi paralizia membrelor inferioare. Toxina principală este *acidul β-N-oxalil-L-α,β-diaminopropionic* (ODAP), un *aminoacid neproteic* din seminţe. Maladia are asemănări clinice evidente cu *paraparezia spastică tropicală* (PST), cu atac insidios la vârsta adultă. În 1985, cercetătorii francezi au descoperit că PST este asociată infecţiei cu HTLV-1 şi au denumit-o HAM (mielopatie asociată cu HTLV-1). Diferenţele majore între cele două sindroame neuropatologice, asemănătoare clinic, constau în următoarele: neurolatirismul afectează în special bărbaţii şi de obicei are caracter epidemic, iar PST-HAM afectează cu precădere femeile şi are caracter endemic.

*Lathyrus sativa* este o plantă foarte rezistentă la secetă. Semînţele sunt folosite ca hrană de către populaţiile din Asia şi Africa în anii secetoşi. Ingestia seminţelor pentru perioade lungi, în contextul malnutriţiei, favorizează apariţia manifestărilor clinice. Maladia debutează cu dureri ale membrelor inferioare sau ale regiunii lombare. Diminuarea controlului musculaturii extremităţilor inferioare şi disfuncţia sfincterelor evoluează într-o paraparezǎ spastică. Aceste simptome diminuă după încetarea consumului seminţelor.

Analiza histologică a evidenţiat leziuni ale SNC, exprimate foarte bine în *fibrele cortico-spinale lungi* şi mai puţin în căile spinocerebeloase. Leziunile sunt considerate ca demielinizări, datorate unor efecte toxice sau unui proces inflamator sau imunitar. În esenţă, neurolatirismul este o *axonopatie central-distală*, a cărei trăsătură dominantă este *degenerarea tracturilor cortico-spinale lungi*, cu leziuni mai limitate ale fibrelor piramidale scurte, care deservesc exremităţile superioare.

Neurolatirismul afectează aproape exclusiv omul. Calul, bovinele, porcul şi păsările sunt influenţate într-o măsură mult mai mică. Modelul experimental al maladiei este cobaiul, adus la starea de deficienţă în acid ascorbic. Acidul ascorbic nu numai că protejează cobaiul de neurolatirism, dar are chiar efect curativ la organismele care suferă de paralizia indusă de consumul seminţelor de *Lathyrus sativa*.

Aminoacizii neproteici care apar în plantele comestibile pot produce îmbolnăviri la om, aşa cum este infirmitatea datorată neurolatirismului. Toxina din seminţele de *Lathyrus sativa* este *aminoacidul neproteic* excitant (ODAP), care acţionează ca analog al *glutamatului* (un mediator sinaptic). Ingestia seminţelor, concomitent cu aportul scăzut de metionină, agravează simptomele. Rolul fiziologic al ODAP în plantă este acela de a lega Zn. β-ODAP leagă ionii bivalenţi cu rol protector faţă de stresul oxidativ, în special Zn, în organismul uman şi animal hrănit cu *Lathyrus sativa*.

$$HOOC - CO - NH - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$$

Acidul β-N-oxalil, L-α,β-diaminopropionic (β-ODAP)

Scanned with OKEN Scanner

Simptomele clinice ale neurolatirismului sunt identice cu ale unei alte maladii ce produce infirmitate, cauzată de *Manihot esculenta* (manioc), preparată insuficient.

S-au identificat alţi doi aminoacizi care produc efecte neurotoxice:

– *acidul diamino-butiric* (DABA), la *Lathyrus sylvestris:*

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$$

Acidul diamino-butiric (DABA)

– *β-aminopropionitril* (BANP), la *Lathyrus odoratus:*

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CN$$

β-aminopropionitril

Semințele de *Lathyrus sativa* produc două tipuri de latirism:

– *neurolatirism;*

– *osteolatirism*, ce constă în dezordini ale creşterii cartilajului care influenţează dezvoltarea oaselor şi aortei (angiolatirism). Efectele patologice ale semințelor de *Lathyrus odoratus* ce constau în deformarea oaselor se datorează BANP, care perturbă sinteza şi legarea colagenului în timpul formării ţesutului conjunctiv. Precursorul β-amilpropionitril se găseşte în plantă şi în semințele imature de *Lathyrus sativa*, ceea ce explică simptomele osteolatirogenice la unii pacienţi cu neurolatirism care au consumat partea vegetativă a plantei.

Cei mai sensibili sunt bărbaţii între 20 şi 30 de ani. Dieta cu semințe de *Lathyrus sativa* nu va fi impusă copiilor, deoarece, în timpul dezvoltării oasele sunt foarte sensibile la factorul toxic. Animalele pot să sufere paralizie, după consumul semințelor pentru perioade lungi. Caii sunt cei mai sensibili.

Semințele de *Vicia sativa* conţin un neurolatirogen – aminoacidul toxic *β-ciano-L-alanina*, care produce neurolatirismul. Concentraţia în semințe variază între 0,1–2,5%.

*Vicia faba* este folosită în hrana omului şi ca supliment proteic pentru animale. Planta nu este toxică în sensul clasic al noţiunii, dar la indivizii sensibili cu predispoziţie genetică produce *favismul*.

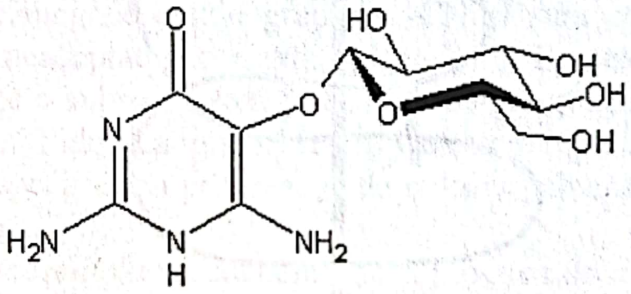
*Favismul* este o maladie metabolică, cu substrat genetic, care se transmite ereditar, cu o frecvenţă superioară mai ales în sudul Europei. În semințele de *Vicia faba* se găsesc 2 proteine termostabile care afectează sănătatea a 100–200 milioane de oameni/glob, deficienţi în glucozo-6-P-dehidrogenază.

Semințele conţin o *lectină hemolitică*. Anemia consecutivă hemolizei poate fi fatală. Mazărea şi fasolea conţin lectine ale căror proprietăţi hemolitice sunt mult atenuate prin fierbere. Consumul semințelor neprelucrate de leguminoase (fasole, mazăre, linte) produce intoxicarea.

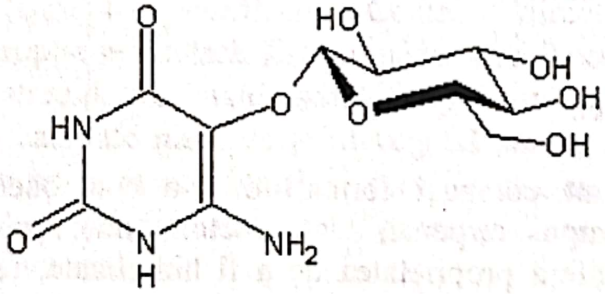
Scanned with OKEN Scanner

Deficitul enzimatic devine evident când seminţele de *Vicia faba* sunt consumate în special în stare crudă sau preparate parţial. Simptomele se manifestă ca hepatită toxică acută şi o stare asemănătoare infecţiei gripale. Bărbaţii sunt afectaţi mai frecvent decât femeile. Mortalitatea este limitată aproape în întregime la copii. Polenul de *Vicia faba* produce manifestări alergice la aceste persoane.

Indivizii sensibili au o deficienţă genetică transmisă prin cromosomul de sex masculin (Y) pentru enzima *glucozo-6-P-dehidrogenaza* (G6PDH). Deficienţa este caracteristică populaţiilor de evrei orientali, europeni mediteraneeni, arabi, asiatici şi negri. În cazurile severe, maladia produce moartea. Animalele, inclusiv porcul, au fost intoxicate după consumul unor cantităţi mari de seminţe de *Vicia faba*. La persoanele cu deficit al sintezei enzimei G6PDH, radicalii oxidanţi nu sunt neutralizaţi şi atacă membrana eritrocitară producând hemoliza. Efectele toxice ale favismului sunt produse de două *glicozide - convicina* şi *vicina* şi de agliconii lor. Persoanele fără anomalia genetică predispozantă nu prezintă riscul intoxicaţiei.




Vicina




Convicina

Seminţele de *Vicia faba* neprelucrate diminuă rata creşterii puilor de găină şi diminuă dimensiunile ficatului şi pancreasului. Scade producţia de ouă, greutatea lor şi rata ecloziunii.

*Robinia pseudacacia* conţine lectine care în sistemul experimental *in vitro*, inhibă sinteza proteinelor. Lectina din salcâm produce diareea, însoţită de deshidratare.

Toxinele de natură proteică ale plantelor sunt asemănătoare proteinelor animale, adică sunt catene lineare de aminoacizi, care se pliază în configuraţia tridimensională ce determină funcţia lor biologică.

Există însă o familie de proteine vegetale, ale căror capete se reunesc prin legătură covalentă şi se formează molecule cu configuraţie (topologie) *circulară*.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru această categorie de peptide macrociclice s-a folosit denumirea de *ciclopeptide* sau *ciclotide*. Activităţile biologice ale ciclopeptidelor sunt diverse, dar multe dintre ele pot fi clasificate ca toxine.

Peptidele macrociclice sunt formate din 30 de aminoacizi, incluzând 6 resturi de Cis bine conservate, iar catena este ciclizată prin legarea extremităţilor catenei. Ciclopeptidele produc o varietate de efecte biologice: activitate anti-HIV, acţiune hemolitică (violapeptidul), activitate uterotonică (kalata $B_1$), activitate antimicrobiană. Aceste molecule, datorită topologiei ciclice, au o rezistenţă excepţională la acţiunea enzimelor proteolitice şi sunt foarte stabile din punct de vedere chimic. Primul compus caracterizat structural a fost *kalata* $B_1$ (fig. 50) din planta tropicală africană *Oldenlandia affinis*, utilizată pentru stimularea travaliului, datorită efectului contractil asupra musculaturii uterine.

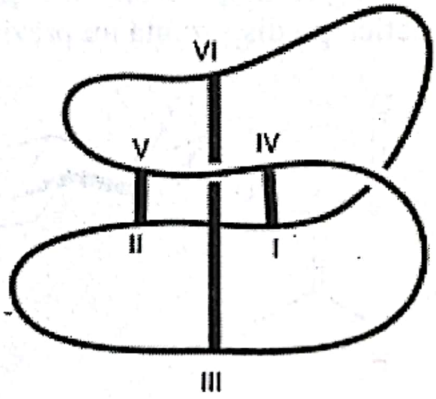



Fig. 50 – Structura spaţială a ciclopepetidului kalata $B_1$
(cifrele romane indică cele 6 resturi de Cys legate prin punţi –S –S – ).

## Glicozide toxice

Glicozidele sunt compuşi formaţi dintr-o componentă glucidică şi una neglucidică (un compus terpenic, fenolic etc.), unite printr-o legătură de tip *acetalic*, care le conferă proprietatea de a fi hidrolizate, rezultând una sau mai multe *molecule glucidice* şi componentul *agliconic*. Termenii de *glucozid* şi *glicozid* se pot folosi cu acelaşi sens, dar denumirea de *glucozid* se foloseşte pentru compuşii al căror glucid este glucoza.

La plante se găsesc câteva tipuri de glicozide, care după hidroliză eliberează substanţe toxice. Marea varietate a acestor substanţe naturale se datorează componentei neglucidice (agliconul), care poate fi reprezentată de alcooli, fenoli, derivaţi hidroxilaţi ai chininelor, flavonoidelor, steroidelor etc.

Glicozizii se găsesc în toate organele plantei: frunze, flori, fructe, seminţe, rădăcină, scoarţă, lemn. Se extrag în soluţie apoasă sau alcoolică şi se pot obţine în stare cristalizată. Majoritatea glicozizilor sunt substanţe incolore, cu gust amar. Unii glicozizi, în doză mică, au acţiune farmacologică, iar în doză mare sunt toxici. Cele mai importante glicozide cu potenţial toxic sunt glicozidele cianogene,

Scanned with OKEN Scanner

glicozidele saponine şi solaninele. Prin hidroliză acidă sau enzimatică, glicozizii se descompun în una sau mai multe molecule de monoglucide sau oligoglucide şi în *aglicon*. Agliconul este legat de glucid prin legătură -C-O-C, formată dintr-o grupare –OH alcoolică sau fenolică şi gruparea –OH semiacetalică a glucidului, rezultând un acetal.

Glicozizii se clasifică după componenta glucidică sau agliconică: glicozizi ai alcoolilor şi fenolilor, ai chinonelor, ai cumarinelor, glicozizi ai altor compuşi heterociclici oxigenaţi, flavonoidici, steroidici, saponine, solanine, glicozizi cianogeni, glicozizi cu S sau cu N etc. De aceea, glicozidele apar în oricare clasă de compuşi ai plantelor, deoarece un eter glucidic se poate lega cu alte molecule în multe modalităţi.

### *Glicozide cianogene*

Glicozidele cianogene conţin gruparea -CN şi sunt compuşi toxici pentru animalele şi omul neadaptat la consumul plantelor şi fructelor. Acidul cianhidric (cianura- HCN) este o substanţă toxică legată şi se găseşte la circa 100 de plante, fiind eliberată prin hidroliza glicozidelor. Detectarea prezenţei HCN se face datorită mirosului specific sau prin reacţia de culoare galbenă-roşu brun, cu hârtie umezită în acid picric.

Toate *euforbiaceele,* dacă sunt consumate, produc tulburări digestive: stare de rău general,vomă, diaree.

*Euphorbia pulcherrina* este o plantă decorativă de casă, mai puţin otrăvitoare decât alte plante ale familiei *Euphorbiaceae*. Contactul direct cu tegumentul poate fi iritant şi produce erupţie veziculară. Este considerată a fi cocarcinogenă. Ingestia frunzelor produce o stare de toxicitate uşoară. Pragul toxicităţii este ridicat, adică trebuie consumată o cantitate mare de ţesut vegetal pentru a se produce o stare toxică. Intoxicaţia se produce accidental la copii, odată cu consumul frunzelor. Apar tulburări digestive, insuficienţa renală, coma şi chiar moartea. Majoritatea intoxicaţiilor umane sunt subacute.

Latexul produce stomatită acută, cu salivaţie excesivă, iritare intensă, ulcere sau vezicule ale mucoasei orale. Contactul latexului cu conjunctiva oculară produce înroşirea conjunctivei sau a scleroticii, conjunctivită, cheratită (inflamaţia corneei) sau edem conjunctival.

În tulpina plantei se găseşte un *latex iritant*, care produce leziuni cutanate. Toate organele plantei sunt toxice, dar tulpinile şi semințele produc leziuni toxice. Latexul conţine euforbiosteroizi, compuşi diterpenici (forbol) şi triterpenici, esteri ai forbolului, toate activatoare ale protein-kinazei C. Aceasta afectează indirect funcţiile unor sisteme enzimatice celulare şi poate produce leziuni ale citoscheletului. Toţi compuşii latexului au proprietăţi iritante pentru mucoasa intestinală, conjunctiva oculară şi tegument. Unul dintre compuşii toxici ai plantei este *acidul cianhidric* (HCN), care se absoarbe rapid la nivelul intestinului. Rareori acidul cianhidric este

Scanned with OKEN Scanner

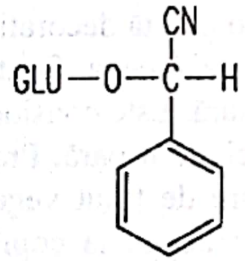
liber, de cele mai multe ori fiind asociat cu un glicozid. În formă legată, complexul acid cianhidric-glicozid nu este toxic, dar sub acţiunea enzimelor digestive, glicozidul se descompune şi eliberează acidul cianhidric. Intoxicaţia produce leziuni hepatice şi renale, al căror nivel se evaluează prin dozarea ALT (alanin-aminotransferaza), AST (aspartat-aminotransferaza), ureii, creatininei. Tratamentul este simptomatic şi constă în îndepărtarea prin spălare a latexului iritant.

Glicozidele cianogenice se găsesc la unele plante din familia *Rosaceae*.

*Prunasina* se găseşte în seminţele de *Prunus virginiana*, un arbust toxic după ingestia fructelor cu seminţe. În toate stadiile de creştere, frunzele plantei conţin prunasină peste nivelul de 1,4%, care produce intoxicaţia acută. Glicozidele – *prunasina* şi *amigdalina* sunt mai concentrate în anii secetoşi. În 100 g de frunze se găsesc 143–243 mg de glicozide cianogene. În frunzele uscate, cantitatea de glicozide este mai mare. Doza letală pentru bovine este echivalentă cu 0,25% din greutatea corporală.

Situaţia este asemănătoare pentru *Amelanchier alnifolia* (familia *Rosaceae*). Toxina are concentraţie maximă în ramurile tinere în sezonul care precede apariţia frunzelor şi în timpul perioadei de înflorire, în special în anii secetoşi. Nivelul maxim al HCN, cu mult peste limita tolerată de ierbivore, apare în sânge la 1–2 ore după ingestie.

Speciile înrudite *Prunus persica* şi *Prunus armeniaca* (caisul) conţin în seminţe o cantitate suficientă de glicozid cianogen pentru a produce moartea omului şi animalelor.




Prunasina

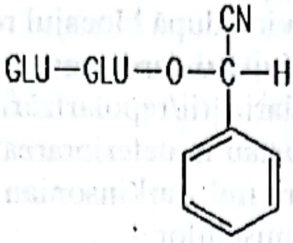
Seminţele, scoarţa şi frunzele migdalului conţin un glicozid – *amigdalina*, care prin hidroliză eliberează *cianură*.

*Amigdalina* se găseşte în seminţele de măr, păr, în seminţele, frunzele şi fructele de cireş, prun şi cais, plantele de trifoi şi sorg. Cianura este asociată cu mirosul amandinelor amare, iar uleiul comercial de amandine este tratat pentru a elimina cianura. După ingestie, amigdalina este metabolizată şi se eliberează *acidul cianhidric*. La doze foarte mici, în tubul digestiv uman are loc disocierea cianurii, care este neutralizată.

HCN este o otravă mortală. $DL_{50}$ a HCN este evaluată la 1,52 mg/kg, dar reacţia la cianură este foarte variabilă în funcţie de vârstă, masă corporală, starea de sănătate. Un sâmbure de cais conţine 2,92 mg HCN/g, seminţele de pară conţin 2,60 mg/g, iar cele de măr – 0,61 mg/g.

Scanned with OKEN Scanner

După ce este ingerată, amigdalina este convertită la HCN şi benzaldehidă, printr-un proces în două trepte:

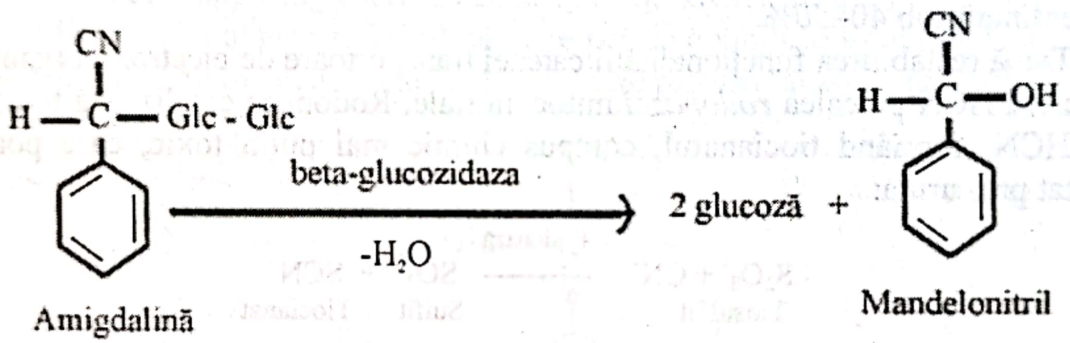



Amigdalina

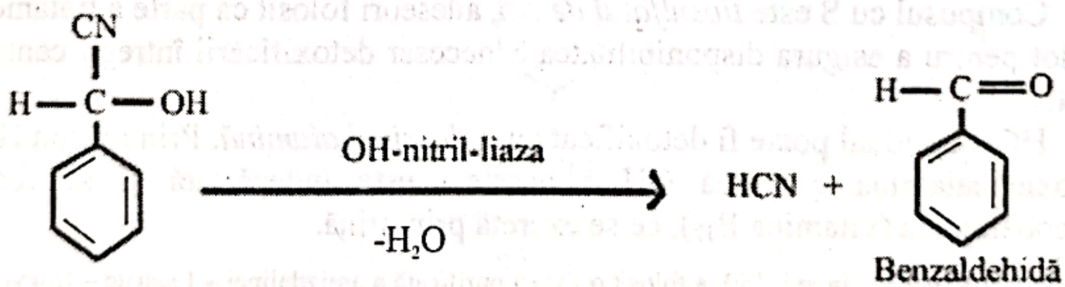
1) amigdalina este metabolizată la două molecule de glucoză şi o moleculă de mandelonitril sub acţiunea glucozidazei;

2) mandelonitritul este convertit la HCN şi benzaldehidă, sub acţiunea enzimei hidroxinitril-liază.

Ambele reacţii necesită o moleculă de apă.




Amigdalină Mandelonitril




Benzaldehidă

HCN este absorbit din tractul gastrointestinal în sânge şi se leagă preferenţial de partea proteică a *citocromoxidazei a-a*$_3$, enzima finală a catenei transportoare de electroni din mitocondrii. Catena transportoare de electroni este asociată membranei. Funcţia catenei transportoare de electroni este de a colecta energia eliberată din reacţiile de oxidare a substratului, sub forma echivalenţilor reducători sau sub forma legăturilor fosfat cu potenţial energetic înalt ce formează ATP.

După legarea HCN de citocromoxidază, transportul electronilor la $O_2$ molecular este inhibat şi astfel este blocată sinteza ATP. Electronii nu mai pot fi tranferaţi la $O_2$ molecular şi nivelul utilizării $O_2$ scade. Presiunea $O_2$ în sânge creşte, iar rata respiraţiei scade.

Scanned with OKEN Scanner

Unul dintre simptomele intoxicaţiei cu HCN este dificultatea respiraţiei. Alte simptome: salivaţie, anxietate, ataxie, vertigo, rigidizarea mandibulei şi o stare de rău general, urmate de convulsii, paralizie, comă, aritmie cardiacă şi insuficienţă respiratorie. Moartea poate să survină după blocajul respirator.

HCN are acţiune asupra activităţii cardiace: creşterea ritmului cardiac, blocaj atrio-ventricular, încetinirea depolarizării/repolarizării ventriculare.

Efectele pe termen lung constau în deteriorarea neurologică, datorită apariţiei leziunilor demielinizante şi sindromul parkinsonian caracterizat prin rigiditate şi pierderea controlului voluntar al muşchilor.

Prima prioritate a tratamentului intoxicaţiei cu HCN este prevenirea legării HCN cu citocromoxidaza a-$a_3$. Se poate administra *nitritul de Na*. Nitritul converteşte hemoglobina la methemoglobină, o formă oxidată a hemoglobinei, care are o afinitate mai mare pentru HCN decât citocromoxidaza a-$a_3$. HCN se eliberează din legătura cu citocromoxidaza şi se leagă cu methemoglobina. Creşterea concentraţiei de methemoglobină scade capacitatea sângelui de a transporta $O_2$. De aceea, se recomandă ca methemoglobinemia indusă terapeutic să fie menţinută sub 40–50%.

După restabilirea funcţionalităţii catenei transportoare de electroni, organismul detoxifică HCN pe calea *rodonazei* mitocondriale. Rodonaza catalizează transferul S la HCN, formând tiocianatul, compus chimic mai puţin toxic, care poate fi excretat prin urină:

$$\underset{\text{Tiosulfat}}{S_2O_3^{-}} + CN^{-} \xrightarrow{\text{Rodonază}} \underset{\text{Sulfit}}{SO_3^{2-}} + \underset{\text{Tiocianat}}{SCN}$$

Compusul cu S este *tiosulfatul de Na*, adeseori folosit ca parte a tratamentului antidot pentru a asigura disponibilitatea S necesar detoxificării întregii cantităţi de HCN.

HCN rezidual poate fi detoxificat cu *hidroxicobalamină*. Prin reacţia HCN cu hidroxicobalamina gruparea OH a acesteia este îndepărtată şi se formează ciancobalamina (vitamina $B_{12}$), ce se excretă prin urină.

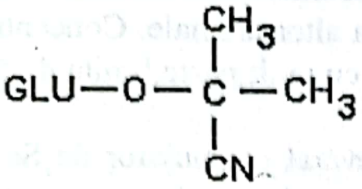
Ernst Krebs jr., în anii '50, a folosit o formă purificată a amigdalinei – Laetrile – (*lae*vorotatory mandelon*itrile*), considerând că HCN din amigdalină poate omorî selectiv celulele tumorale, plecând de la presupunerea că β-glucozidaza este mai abundentă în celulele canceroase şi că celulele tumorale sunt deficiente în rodonază, enzima care detoxifică HCN. Premisele au fost eronate: β-glucozidaza este în cantităţi urmă în celulele animale, iar nivelul rodonazei este acelaşi în celulele tumorale şi în cele normale.

Mai multe leguminoase *Fabaceae* conţin *glicozide* care după disociere produc *cianură*.

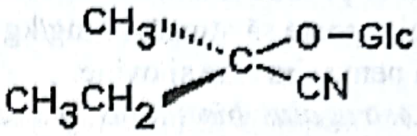
*Trifolium repens* (trifoiul alb) produce flatulenţa (umflarea) ierbivorelor După ce sunt ingerate, unele varietăţi pot elibera HCN, cauzând intoxicaţia cianogenă. Planta conţine două glicozide cianogene – *linamarina* şi *lotaustralina*. În frunzele tinere, nivelul HCN poate atinge 350 mg/100 g ţesut vegetal. Cianogeneza este

Scanned with OKEN Scanner

controlată de două gene moştenite independent. Numai plantele care au cel puţin o alelă funcţională dominantă, eliberează HCN.



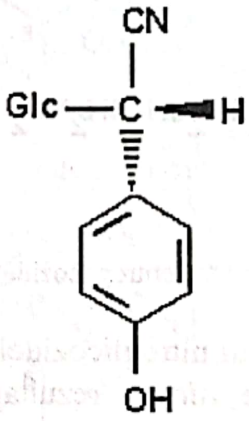

Linamarina




Lotaustralina

În fructele de *Sambucus nigra* (soc), în seminţe, frunze, fructe şi în scoarţă se găsesc *glicozide cianogene: sambucigrina şi vicianina.* Acidul cianhidric se eliberează sub acţiunea enzimelor tractului digestiv. Ingestia fructelor neprelucrate, la om produce tulburări digestive. Prelucrarea termică anulează toxicitatea glicozizilor.

*Sorghum sudanense* şi *Sorghum halepense* conţin *durina, un glicozid* care eliberează HCN, după îngheţarea, masticaţia sau stresul de uscăciune al plantelor. Nivelul HCN eliberat este suficient de mare pentru a produce intoxicaţia animalelor: HCN determină hipoxia cu efecte citotoxice, care produce moartea prin asfixie.




Durina

### *Nitroglicozide*

Unele plante produc intoxicaţia organismului consumator prin acumularea unor concentraţii mari de *nitraţi.* Altele sintetizează *nitroglicozide*, care prin hidroliză eliberează nitratul.

Plantele genului *Sorghum* acumulează cantităţi toxice de *nitraţi*, care după reducerea la nitriţi în tractul digestiv, duc la formarea methemoglobinei. În cazurile severe moartea survine la 4–6 ore după ingestie.

*Helianthus annuus* produce dermatita alergică de contact la persoanele sensibile, datorată lactonelor sesquiterpenice conţinute în perii glandulari multicelulari.

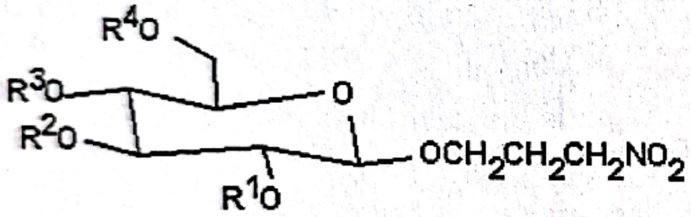
Scanned with OKEN Scanner

Bovinele s-au intoxicat după ingestia plantelor cu seminţe imature, ca rezultat al toxicităţii *nitratului*, care a produs îmbolnăvirea şi moartea.

Speciile de *Astragalus* (plante ierboase) acumulează niveluri toxice de *seleniu* şi produc intoxicaţia bovinelor şi probabil a altor animale. Concentraţia Se acumulat poate să atingă 44 mg/kg de ţesut vegetal, cu mult peste limita de 5 mg/kg toxică pentru bovine şi ovine.

*Astragalus bisculatus* este considerat un adevărat acumulator de Se. Cantităţile mari de Se concentrate în ţesuturile plantei produc toxicitatea acută: mers nesigur, diaree, prostraţie, durere abdominală. Această plantă conţine *swainsonina*, un *alcaloid* toxic.

Adeseori frunzele au miros respingător, iar unele conţin *nitroglicozide*. Nitroglicozidele sunt substanţe toxice pentru bovine, deoarece sunt supuse modificărilor metabolice sub acţiunea enzimelor microorganismelor ruminale sau în hepatocite, rezultând derivaţi foarte toxici (de exemplu, acidul 3-nitropropionic). Acidul 3-nitropropionic are acţiune letală pentru că inhibă enzima vitală *succinat-dehidrogenază* mitocondrială şi blochează astfel sinteza ATP, incompatibilă cu viaţa celulei.




2 $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$

3 $R^1 = R^2 = R^3 = H$ $R^4$= Glc

4 $R^1 = R^3 = R^4 = H$ $R^2$= Glc

5 $R^1 = R^2 = R^4 = H$ $R^3$= Glc

Nitroglicozide

Alt mecanism al toxicităţii nitroglicozidelor constă în oxidarea hemoglobinei la *methemoglobină*, de către *nitriţii* rezultaţi prin hidroliza *nitroglicozizilor*. Methemoglobina nu transportă $O_2$.

*Astragalus miser*, o plantă ierboasă, produce intoxicaţia acută şi cronică la bovine şi ovine. Experimental, efectele toxice s-au produs şi la alte animale domestice. În frunzele plantei se găseşte *miserotoxina*, al cărei nivel scade odată cu uscarea. Ureea creşte concentraţia toxinei în plantă.

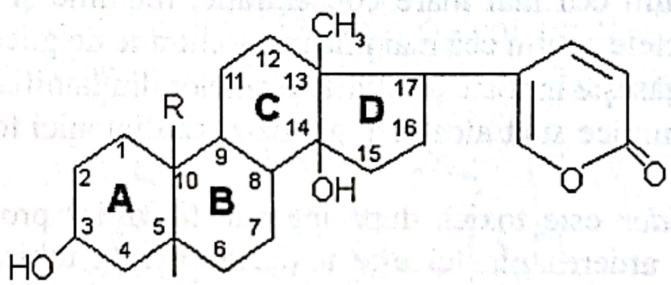
Miserotoxina este un *nitroglicozid*, care se hidrolizează repede sub acţiunea microorganismelor din rumen şi rezultă acidul *3-nitropropionic*. Efectul toxic acut este datorat acţiunii oxidante a *nitritului* asupra hemoglobinei care este convertită la *methemoglobină*. Bovinele şi ovinele se pot intoxica prin consumul a 60–80 mg/kg corp. În măduva spinării şi în nervii periferici se produce degenerarea valeriană, iar în creier apar focare hemoragice. Animalele în lactaţie sunt cele mai sensibile la toxină. În tractul digestiv al nerumegătoarelor, toxina nu este convertită la acid 3-nitropropionic.

Scanned with OKEN Scanner

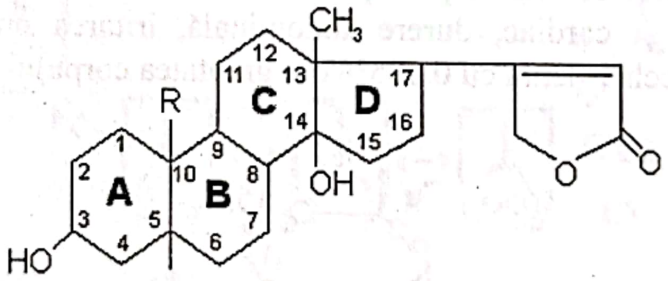
*Avena sativa* (ovăzul) este o sursă relativ comună a intoxicaţiei prin *nitrat* la animalele domestice. Cele mai sensibile sunt bovinele. Umiditatea favorizează reducerea bacteriană a nitratului la *nitrit*, mai toxic.

### *Glicozide cardiotonice*

*Glicozidele cardiotonice* se găsesc la plante din familia *Scrophulariaceae*, *Apocynaceae* (*Apocynum androsaemifolium*), *Liliaceae, Moraceae, Ranunculaceae* şi *Asclepiadaceae*, la insectele care se hrănesc cu aceste plante şi în glandele parotide şi tegumentare ale unor broaşte din genurile *Bufo, Atelopus* etc. Agliconii glicozidelor cardiotonice poartă denumirea generică de *genine* şi au o structură *steroidică* ce se caracterizează printr-un *inel lactonic* nesaturat legat la $C_{17}$. Glicozidele cardiotonice, în funcţie de grupul lactonic, sunt de două tipuri: *inelul lactonic* poate avea *5 atomi* de C (la cardenolide) sau *6 atomi* de C (la bufadienolide).




Bufadienolide




Cardenolide

Cardenolidele, mult mai răspândite, sunt steroizi C23 şi au o *butirolactonă* nesaturată cu 5 atomi de C.

Bufadienolidele sunt steroizi C24 şi au un inel *pironic* (6 atomi de C).

Nucleul steroidic are grupele –OH la poziţiile 3 şi 14, iar glucidul este ataşat prin intermediul unui atom de O la $C_3$ al inelulului A al steroidului. Gruparea OH din poziţia $C_{14}$ nu este substituită. Ciclul lactonic la poziţia 17 este o trăsătură structurală importantă. Resturile glucidice în număr de 1–4 sunt ataşate la gruparea $C_3$-OH la toate glicozidele cardiotonice. Cele mai comune sunt L-ramnoza, D-glucoza, D-digitaloza, D-fructoza etc. şi se găsesc în configuraţia β. Prezenţa grupului acetil

Scanned with OKEN Scanner

ataşat la glucid influenţează caracterul lipofil al glicozidului. Componenta glucidică pare a fi importantă numai pentru dinamica acţiunii, dar nu are activitate biologică. Lactona singură, neataşată de scheletul steroidic, nu are activitate biologică. Activitatea glicozidului rezidă în componenta *steroidică*.

Glicozidele cardiotonice sunt solubile în apă, etanol şi foarte puţin solubile în alţi solvenţi care nu conţin gruparea –OH. Efectul farmacodinamic major constă în ameliorarea nutriţiei muşchiului cardiac, prin creşterea cantităţii de sânge. Efectele favorabile se resimt la 12 ore. Medicamentele pot produce tulburări digestive, datorate digitoninei. Acţionează la nivelul rinichiului şi au acţiune diuretică.

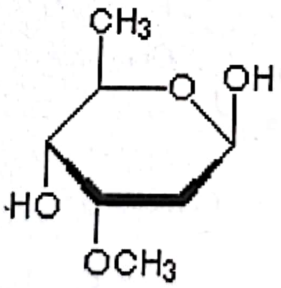
Familia *Apocynaceae* este recunoscută pentru că unii dintre reprezentanţii săi produc cele mai puternice substanţe cardiostimulatoare.

În cazul plantei *Acokanthera oppositifolia* (numele genului reflectă forma ascuţită a anterelor, iar denumirea speciei se referă la aranjamentul opus ale frunzelor), toate organele sunt foarte toxice, cu excepţia posibilă a fructelor mature. Substanţele toxice sunt *glicozide* asemănătoare *ouabainei*.

Seminţele conţin cea mai mare concentraţie, tulpinile şi frunzele sunt mai puţin toxice, iar fructele conţin cea mai mică concentraţie de glicozid toxic. Latexul de culoare albă, se găseşte în toate ţesuturile plantelor din familia *Apocynaceae*.

Substanţele chimice sunt alcaloizi, glicozizi cardiotonici toxici în doze mari, răşini.

*Nerium oleander* este toxică după ingestia frunzelor proaspete sau uscate. Fumul rezultat din arderea plantei este toxic. Substanţa toxică este un *glicozid* cardiotonic, care se găseşte în toate organele plantei, inclusiv în nectar. Intoxicaţia experimentală a cailor cu frunze proaspete de *Nerium oleander* produce creşterea ritmului respirator şi cardiac, durere abdominală, iritarea mucoasei bucale. O cantitate de frunze echivalentă cu 0,005% din greutatea corpului are efect mortal.




Cimaroza – glucidul glicozidului cardenolidic
cardiostimulator cimarim din *Apocynum cannabinum*

Cardenolidele se clasifică după componenta chimică a agliconului, în lanataglucozide A, B, C, D şi E. Numai *Digitalis lanata* conţine toate cele 5 forme.

Zahărul din glicozid se disociază în tubul digestiv şi eliberează compusul activ.

*Mecanismul de acţiune*. Glicozidele steroidice sunt compuşi cu structură hormonală, cu acţiune asupra ţesutului cardiac şi renal. Influenţează contractilitatea

Scanned with OKEN Scanner

muşchiului cardiac, având efect cardiotonic. Pompele de $Na^+/K^+$ sunt singurele ţinte ale glicozidelor cardiotonice, deşi nu toate pompele $Na^+/K^+$ sunt la fel de sensibile.

Procesul depolarizării/repolarizării membranei este controlat de dinamica a 3 cationi: $Na^+$, $Ca^{2+}$, $K^+$. Intrarea şi ieşirea lor din celulă sunt procese de transport activ, mediate de *pompe ionice*. În repaus, concentraţia $Na^+$ este mai mare în mediul extracelular. Odată cu depolarizarea membranei, $Na^+$ pătrunde în celulă şi determină formarea *potenţialului de acţiune*. Creşterea nivelului $Na^+$ în celulă, declanşează influxul $Ca^{2+}$, care se produce mai lent, datorită dimensiunilor sale superioare. Creşterea concentraţiei de $Ca^{2+}$ în celulă induce efluxul $K^+$. Restabilirea potenţialului de repaus se produce prin inversarea schimbului $Na^+$-$K^+$. Transportul ionilor de $Na^+$ şi de $K^+$ necesită energie furnizată de *ATP-aza $Na^+$-$K^+$* (fig. 51). Glicozidele cardiotonice pot fi definite ca *inhibitori alosterici ai ATP-azei $Na^+$-$K^+$*. Rezultatul este diminuarea schimbului $Na^+$-$K^+$. Glicozidele cardiotonice se leagă de pompă când situsurile de legare ale $Na^+$ sunt deschise spre latura citoplasmatică, situaţie în care leagă 3 ioni de $Na^+$. În celulă rămâne un nivel crescut de $Na^+$, care antrenează *creşterea nivelului $Ca^{2+}$ intracelular*. Nivelul crescut al $Ca^{2+}$ intracelular declanşează o serie de evenimente biochimice citoplasmatice al căror rezultat este creşterea forţei contractile a miocardului (efect inotropic pozitiv).

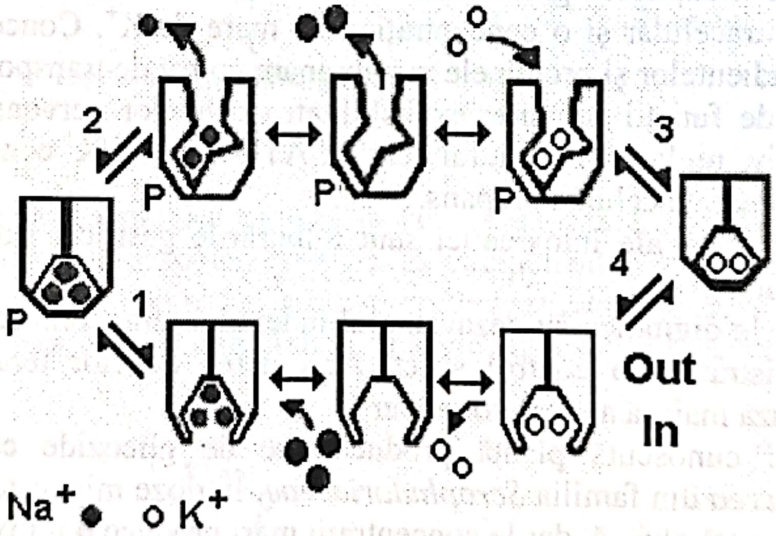



Fig. 51 – Reprezentarea schematică a ciclului funcţional al pompei $Na^+/K^+$. Fiecare desen este orientat cu faţa citoplasmatică în jos. Când situsurile de legare sunt deschise spre faţa citoplasmatică, pompa are afinitate mare pentru ionul de Na, iar când sunt deschise spre faţa extracelulară, pompa are afinitate mare pentru ionul de K. Pe faţa citoplasmatică, pompa leagă 3 ioni de Na, se autofosforilează şi se închide (1). Imediat se deschide situsul extracelular (2). Se eliberează un ion de Na, iar ceilalţi doi sunt înlocuiţi de ioni de K. După legarea ionilor de K, situsul extracelular se închide şi pompa se defosforilează (3). Se deschide situsul citoplasmatic şi ionii de K pot fi înlocuiţi de ionii de Na (4).

Concentraţiile terapeutice ale compuşilor digitalici produc o inhibiţie moderată (30%) a enzimei (ATP-aza). Când celula se depolarizează, în interiorul acesteia se găseşte o cantitate inferioară de enzime disponibile pentru restabilirea echilibrului $Na^+$-$K^+$. Enzima care rămâne activă (70%) va acţiona mai rapid,

Scanned with OKEN Scanner

datorită concentraţiei mari de $Na^+$. Echilibrul ionic trebuie restabilit înainte de depolarizarea următoare, deşi va necesita un interval mai lung. Acest lag va induce o creştere temporară a $Na^+$ în celulă. Creşterea temporară a $Na^+$ modifică concentraţia $Ca^{2+}$ printr-un schimb $Na^+/Ca^{2+}$, care permite ieşirea $Na^+$ la schimb cu $Ca^{2+}$ sau a $Ca^{2+}$ la schimb cu $Na^+$, în funcţie de prevalenţa gradientului electrochimic de $Na^+$ sau de $Ca^{2+}$. Acest mecanism scade rata de schimb sau chiar inversează transportul ionic prin membrană, $Ca^{2+}$ fiind transportat în celulă. Odată cu creşterea $Ca^{2+}$ intracelular, creşte forţa contractilă a muşchiului cardiac. Prelungirea fazei de relaxare a inimii (a diastolei ventriculare) permite ventriculului stâng o mai bună umplere cu sânge. Creşterea volumului sanguin este urmată de o sistolă ventriculară mai puternică. După contracţie, refluxul închide valva semilunară a aortei, iar arterele coronare se umplu cu sânge.

*Supradoza* are toxicitate înaltă, accelerează ritmul inimii, conducând la insuficienţă cardiacă. Inhibiţia ATP-azei $Na^+$-$K^+$ atinge rata de 60%. Transportul $Na^+$-$K^+$ scade atât de mult încât, în timpul diastolei, înainte de depolarizarea următoare, nu mai este posibilă restabilirea nivelelor ionice normale. Creşterea excesivă a $Na^+$ şi $Ca^{2+}$ în celulă produce efecte toxice (aritmia).

Pompa $Na^+/K^+$ se găseşte în marea majoritate a celulelor animale. Funcţia sa fiziologică este menţinerea gradientelor chimice $Na^+/K^+$ în celulă, cu concentraţii mici de $Na^+$ intracelular şi o concentraţie mai mare de $K^+$. Concentraţiile ionice, menţinerea gradientelor şi proteinele membranare cu rol de transport condiţionează o gamă largă de funcţii celulare: excitabilitatea celulelor nervoase şi musculare, transportul activ, reglarea volumului celular. ATP-aza $Na^+/K^+$ consumă circa 25% din ATP consumat de celulă în repaus.

Alte simptome ale intoxicaţiei sunt tulburările gastrice, starea de confuzie mentală, convulsii.

Glicozidele digitalice au dezavantajul indexului terapeutic scăzut şi de aceea trebuie administrate sub control strict. Apropierea dozelor terapeutice de cele toxice este cauza majoră a efectelor adverse.

Cea mai cunoscută plantă producătoare de glicozide cardiotonice este *Digitalis purpurea* din familia *Scrophulariaceae*. În doze mici este un medicament de mare importanţă clinică, dar la concentraţii mari produce o intoxicaţie mortală.

*Digitalis purpurea* este sursa farmaceutică a *digitalinei*, un glicozid cardiotonic*, asociat cu un steroid şi un eter ciclic (lactona) (fig. 52). Digitalina este primul glicozid cardiotonic izolat în stare cristalină. Se găseşte în sucul, seminţele şi în frunzele plantei. Cea mai mare concentraţie se găseşte în frunze, chiar în cele uscate. Glicozidele cardiotonice micşorează rata contracţiei muşchiului cardiac, măresc randamentul contracţiei cardiace, diminuă hipertrofia muşchiului inimii şi reduc presiunea venoasă, deoarece acţionează asupra centrului cardioinhibitor al vagului.

* Doza medicală are efecte miraculoase la persoanele care suferă de insuficienţă cardiacă congestivă. Bolile cardiace pot fi grupate în 3 categorii: *insuficienţă, ischemie* şi *aritmie*. Insuficienţa cardiacă poate fi definită ca incapacitatea inimii de a pompa sângele la o rată cerută de necesităţile metabolice ale ţesuturilor. Insuficienţa apare în primul rând datorită contractilităţii scăzute a muşchiului

Scanned with OKEN Scanner

cardiac, în special a ventriculilor. Contractilitatea redusă a inimii antrenează scăderea cantităţii de sânge pompat. Reîntoarcerea sângelui determină creşterea volumului sanguin cardiac. Inima este congestionată şi de aici derivă denumirea de *insuficienţă congestivă*. Inima congestionată duce la scăderea presiunii sanguine şi la o curgere insuficientă a sângelui spre rinichi. Rezultatul este apariţia edemului în extremităţile inferioare şi în plămâni, ca şi a insuficienţei renale. Supradoza poate fi fatală. Intoxicaţia animalelor sau a copiilor survine după consumul accidental al frunzelor, florilor sau al nectarului. Digoxina a influenţat creaţia lui Vincent van Gogh (1853–1890), a cărui epilepsie a fost tratată cu glicozidul din *Digitalis purpurea*. Lucrarea sa "The Starry Night" (Noaptea înstelată) redă cercuri galbene în jurul stelelor, similare cu halucinaţiile vizuale pe care le au pacienţii intoxicaţi cu digoxină.

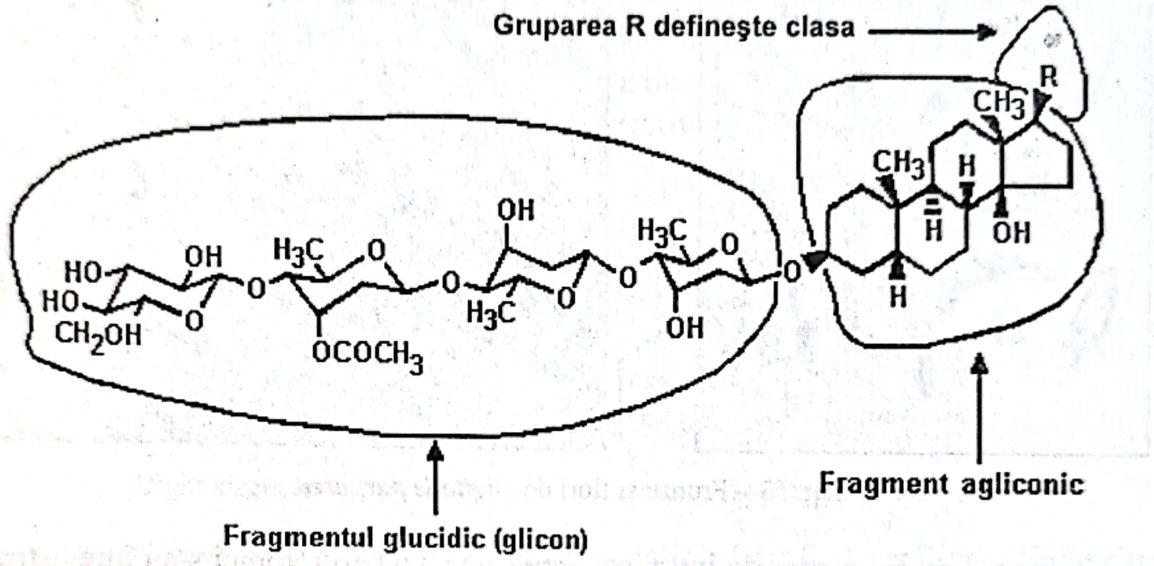
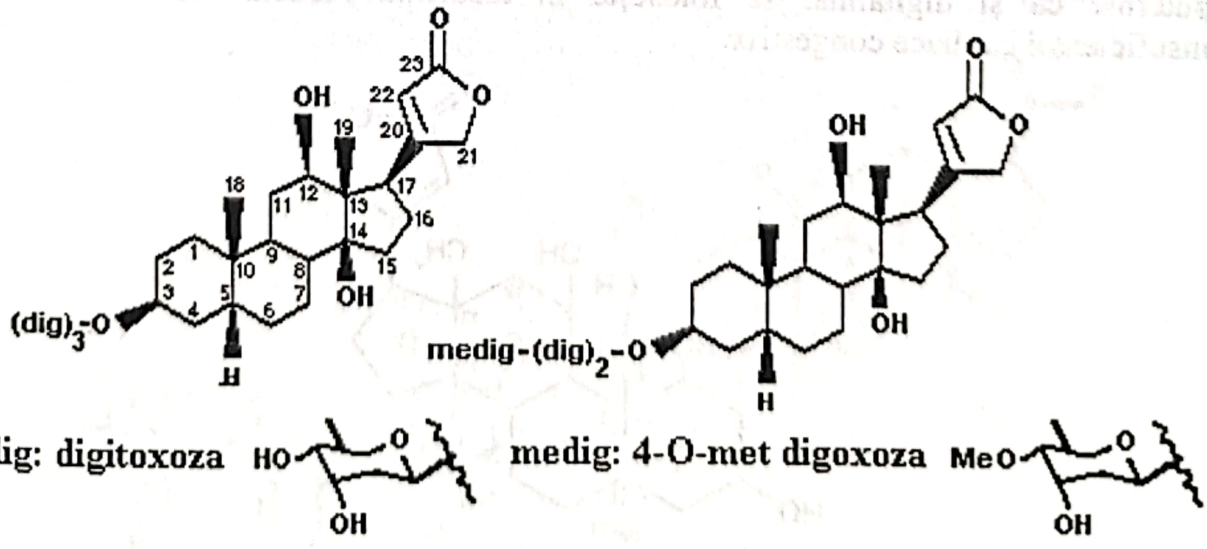



Fig. 52 – Structura moleculară a digitalinei.

Activitatea farmacologică variază în funcţie de diferenţele de compoziţie ale produsului natural sau introduse sintetic în componentul steroidic sau glucidic. Preparatele farmaceutice comune sunt *digitalina, digitoxina, digoxina*. Folosirea îndelungată stimulează activitatea inimii, dar are ca rezultat hipertrofia muşchiului cardiac.




Structura digoxinei (I) şi metil digoxinei (II)

Digitoxina este cea mai toxică dintre toţi glicozizii cardiotonici din *Digitalis purpurea* (fig. 53). Glicozizii sunt clivaţi prin hidroliză într-un glucid şi agliconul digitoxigenina. Agliconii au efect direct asupra muşchiului cardiac.

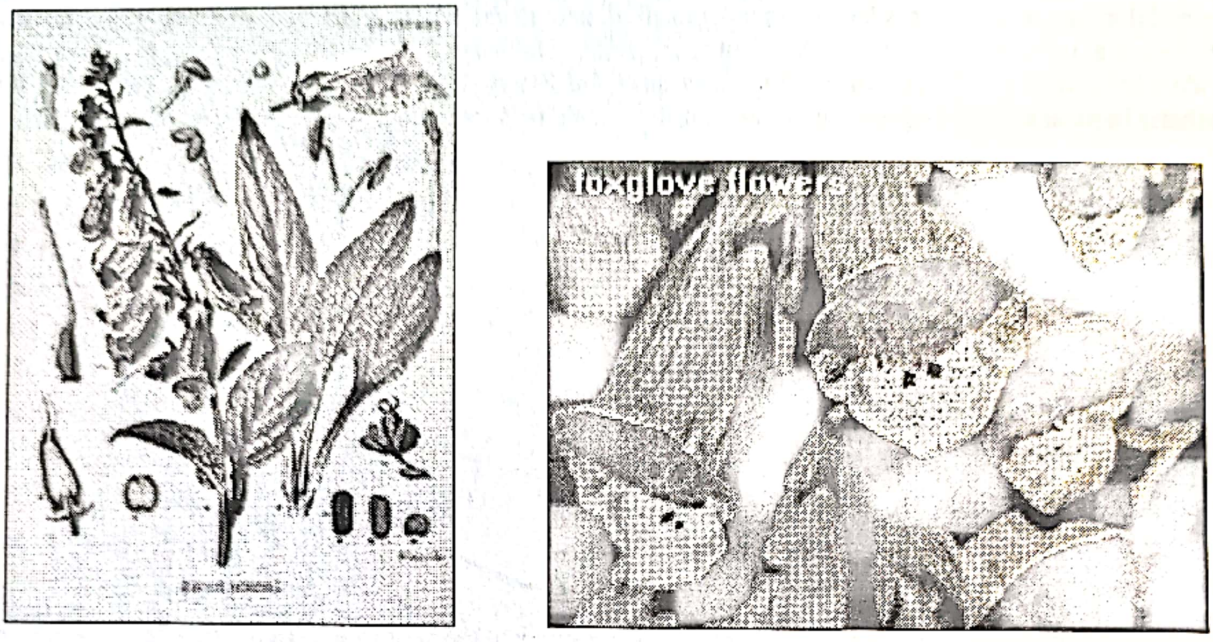
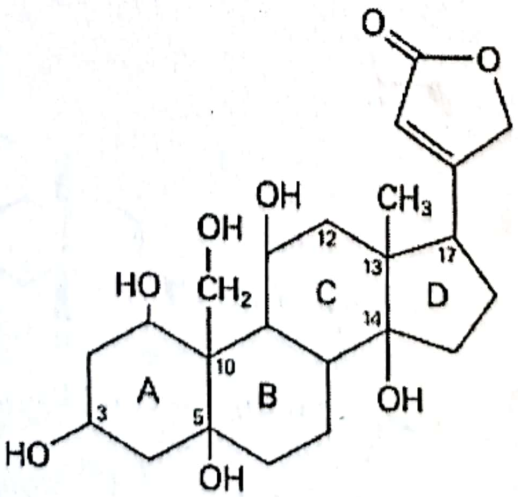



Fig. 53 – Frunze şi flori de *Digitalis purpurea*.

Cele mai multe cazuri de intoxicaţie cu glicozizi cardiotonici s-au înregistrat la pacienţii supradozaţi în timpul tratamentului de lungă durată al insuficienţei cardiace.

Seminţele de *Strophantus kombi, Strophantus hispidus, Strophantus gratus* şi în lemnul copacului *Acokanthera oppositifolia* (*strophos*, grec = frânghie deformată; *anthos* = floare, datorită particularităţilor aspectului său, limbul corolei fiind divizat în 5 segmente) sunt bogate în *K-strofantină* şi *G-strofantină* sau *ouabaină.*

*Strofantina-G (ouabaina)*, un glicozid din clasa *cardenolidelor*, la fel de puternic ca şi digitalina, se foloseşte în medicina modernă în tratamentul insuficienţei cardiace congestive.



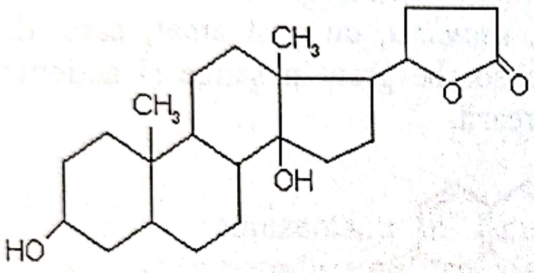

Ouabagenina

Scanned with OKEN Scanner

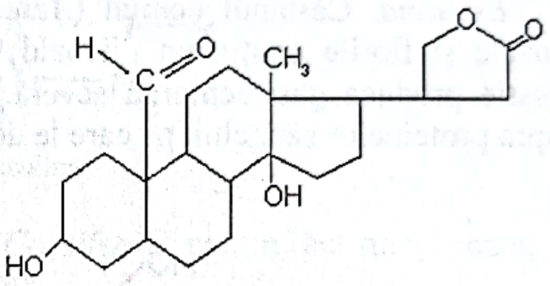
Este un glicozid toxic cu aspect de pulbere albă cristalină ($C_{29}H_{44}O_{12}$). Doza letală pentru omul adult este de 0,002 g. Seminţele câtorva specii se folosesc pentru prepararea otrăvii de săgeată în Africa. Componentele toxice sunt glicozidul strofantina şi un alcaloid.

În mediul acid, strofantina, solubilă în apă şi în alcool, este hidrolizată în glucoză şi *strofantidină*, un compus fără N.

*Thevetia peruviana*, cultivată în regiunile tropicale şi subtropicale, conţine în seminţe cel puţin 8 *glicozide* cardiotonice: *thevetina A, thevetina B, thevetoxina, neriifolina* etc. Toate organele plantei sunt toxice, dar concentraţia cea mai mare a glicozizilor se găseşte în seminţe. Seminţele masticate şi înghiţite sunt toxice. După scindarea glucidului sub acţiunea enzimelor digestive rezultă *digitoxigenina.*



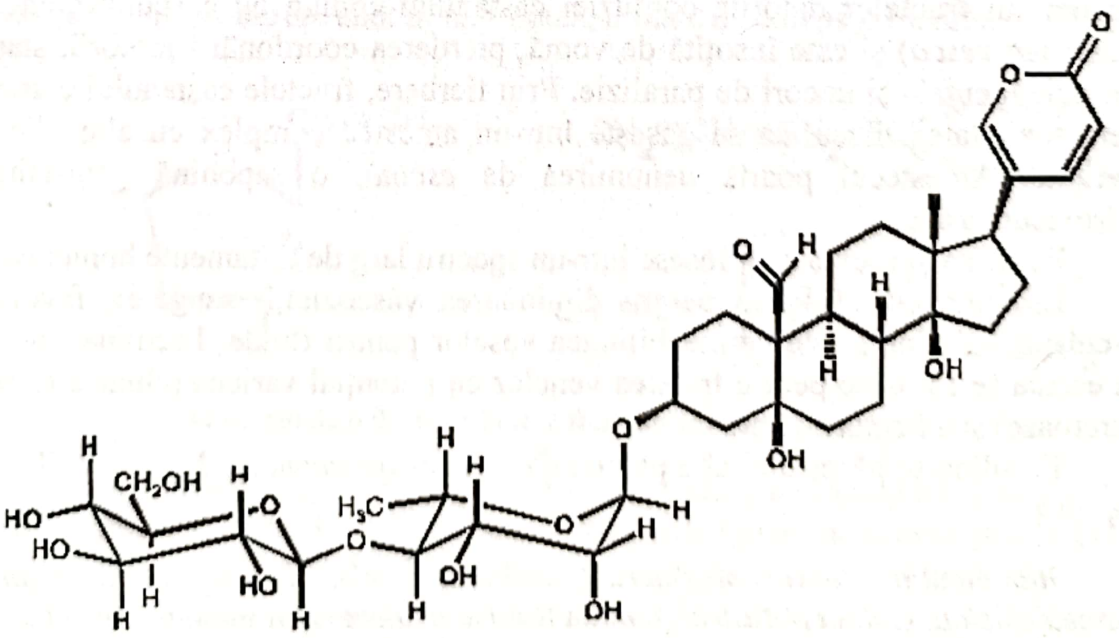

Digitoxigenina




Strofantidina

Aceste glicozide sunt cardiotonice, dar în clinică au fost preferate digitoxina şi ouabaina datorită efectelor colaterale digestive mai reduse.

Glicozidul din *Helleborus niger – helebrina* – este un narcotic şi purgativ, dar i se atribuie chiar proprietăţi anticarcinomatoase. Face parte din clasa glicozidelor cardiotonice *bufadienolide*. Componenta agliconică a helebrinei – *helebrigenina* – este mai activă decât glicozidul complet.

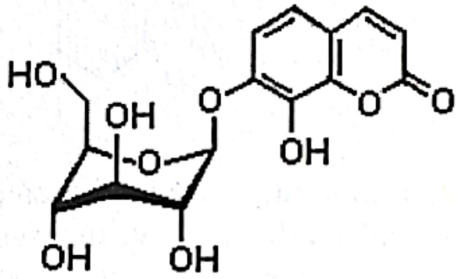



Helebrina

*Scilla maritima, Scilla siberica* (familia *Liliaceae*) conţin un amestec de glicozide toxice, care produc efecte asemănătoare digitalinei: *scilaren A* – un *glicozid steroidic* este hidrolizat la glucoză şi *proscilaridin A*. Ultimul poate fi hidrolizat la ramnoză şi agliconul steroidic *scilaridina A*. Are aceleaşi acţiuni şi utilizări ca şi glicozizii din *Digitalis purpurea*. După ingestie pot produce intoxicaţie, iar la indivizii sensibili, iritaţie tegumentară. Glicozidul se găseşte în toate organele plantei.

Bulbii de *Scilla maritima* au fost utilizaţi ca sursă de rotenticide, înlocuite apoi de warfarin (raticidul anticoagulant). Rozătoarele au dobândit rezistenţă la aceste substanţe şi interesul pentru *glicozizii sciladienolodici* (scilirozida) foarte toxici din *Scilla maritima* a renăscut.

*Esculina.* Castanul comun (*Aesculus hippocastanum*) este toxic. Fructele, frunzele şi florile conţin un glicozid toxic, *esculina*, cu gust amar, care, după ingestie produce gastroenterită severă. Se absoarbe greu în sânge şi acţionează asupra proteinelor sângelui, pe care le denaturează.




Esculina

Ingestia dozelor mari de esculină, rareori fatală, se produce consecutiv consumului fructelor datorită confuziei castanului comun cu castanul comestibil (*Castanea vesca*) şi este însoţită de vomă, pierderea coordonării motorii, stare de confuzie mentală şi uneori de paralizie. Prin fierbere, fructele castanului comun îşi pierd toxicitatea. Esculina se găseşte într-un amestec complex cu alte glicozide acetilate. Amestecul poartă denumirea de *escină*, o saponină înrudită cu hidroxicumarina.

Esculina şi escina se folosesc într-un spectru larg de tratamente homeopatice.

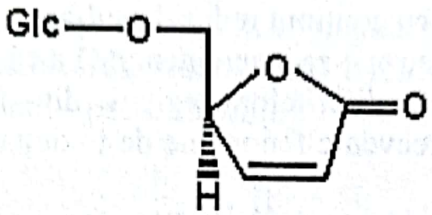
Esculina este folosită pentru diminuarea vâscozităţii sângelui, favorizând circulaţia. Escina scade permeabilitatea vaselor pentru fluide. Esculina împreună cu escina se folosesc pentru tratarea venelor cu potenţial varicos (chiar a formelor dureroase) şi a hemoroizilor.

Esculina se găseşte în alte plante: *Crataegus oxyacantha, Fraxinus, Bursaria spinosa.*

*Ranunculina. Ranunculus acris* (floarea broaştei), *Clematis, Ceratocephalus, Actaea spicata, Caltha palustris* (familia *Ranunculaceae*) conţin un *glicozid lactonic, ranunculina*, care sub acţiunea enzimelor celulare eliberate prin strivirea ţesutului,

Scanned with OKEN Scanner

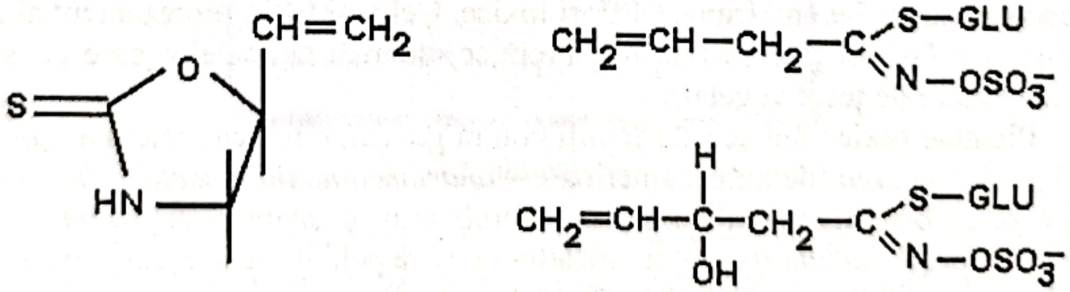
se modifică la *protoanemonină*, un ulei volatil, de culoare galbenă, cu acţiune iritantă tegumentară gravă. După ingestie, plantele produc o senzaţie intensă de arsură a tubului digestiv, urmată de convulsii. Gustul lor este foarte neplăcut, iar stadiul digestiv al intoxicaţiei este rareori atins. Consumul a 7 g ţesut vegetal/kg corp produce fenomene toxice la ovine, cu tahicardie, dispnee, anorexie. Analiza necroptică a relevat edem al suprafeţei peritoneale, hemoragie subendocardică în ventriculul stâng şi congestia inimii, rinichiului şi plămânilor. Severitatea intoxicaţiei este corelată cu cantitatea de ţesut vegetal ingerat. Moartea survine ca rezultat al insuficienţei sistemului cardiovascular.




Ranunculina

Câţiva reprezentanţi ai familiei *Cruciferae* conţin substanţe care, prin supradozare pot produce efecte toxice.

*Glucozinolaţi*. *Armoracia rusticana* (hreanul) din familia *Cruciferae* este o plantă cultivată, care produce efecte toxice la animalele domestice. Sunt toxice atât frunzele cât şi rădăcinile. La persoanele care folosesc rădăcina pentru condimentarea alimentelor, efectul este iritarea mucoaselor. Substanţele iritante sunt compuşi cu S şi N, legaţi cu o singură moleculă de glucoză, denumiţi *glucozinolaţi* şi *S-metil-L-cistein-sulfoxid* (SMCO). Efectele toxice la porc s-au produs după ingestia rădăcinii de hrean, echivalentă cu 1% din greutatea corporală. Se produce inflamaţia acută a mucoasei gastrice, durere abdominală acută, urmate de colaps şi moarte.




Glucozinolaţii din rădăcinile şi frunzele de *Armoracia rusticana*

Acelaşi amestec de glucozinolaţi toxici se găseşte în frunzele şi seminţele de *Thlaspi arvense*. În perioadele de secetă, consumul mare al acestei plante (65 mg de glucozinolaţi/kg corp) de către rumegătoare produce avortul şi moartea.

Glucozinolaţii cu potenţial toxic se găsesc în seminţele şi frunzele de *Sinapis arvensis*, *Raphanus sativa* (ridiche), *Brassica oleracea* (varza), *Brassica napus*

Scanned with OKEN Scanner

(nap). Toate aceste specii sintetizează SMCO, care produce anemie hemolitică la om şi animale, iar glucozinolaţii au efecte guşogene la om.

Factorii guşogeni inhibă funcţia tiroidei. Tiocianaţii şi izotiocianaţii inhibă înglobarea iodului în glanda tiroidă şi sinteza hormonilor tiroidieni. Din glucozinolaţi rezultă nitrilii, toxici pentru rinichi şi ficat.

SMCO este un *α-aminoacid*, care cauzează anemia hemolitică la animalele domestice. Acest compus se găseşte la anumiţi membri din genurile *Brassica* şi *Raphanus* ca şi la genul *Allium* din familia *Liliaceae*. Cantitatea de SMCO în varza creaţă se poate dubla odată cu maturarea plantei. Cantitatea SMCO creşte prin adăugarea azotului la solurile bogate în sulfat. SMCO are o concentraţie redusă în plantele crescute pe solul cu conţinut redus de sulfat.

Glucozinolaţii pot cauza o reducere generală a câştigului în greutate la porc.

Buruienile specifice diferitelor regiuni din familia *Fabaceae* (ordinul *Leguminosales*) produc frecvente fenomene de toxicitate, al căror mecanism poate să implice:

– niveluri toxice de *seleniu* absorbit din sol;
– conţinutul crescut de *nitroglicozide* (glucide azotate);
– prezenţa unor *alcaloizi*, ca de exemplu *swainsonina*, care produc starea de intoxicare denumită „locoism".

Inul, producător de ulei şi de fibre textile, conţine glicozide a căror concentraţie variază în funcţie de specie, de sezon şi de climat.

Genul *Aloe* cuprinde plante tropicale care conţin *glicozide* toxice, dacă sunt ingerate în cantitate mare. Extractele acestor plante intră în compoziţia unor compuşi cosmetici pentru întreţinerea tegumentului, care produc dermatita alergică de contact şi a unor medicamente cu efecte purgative. Ingerarea latexului are acţiune inflamatorie.

*Rhododendron, Azalea* (arbuşti ornamentali cultivaţi pentru florile viu colorate sau speciile din flora spontană), *Kalmia* (laurul de munte) din familia *Ericaceae,* au totdeauna frunze şi flori toxice. Cel mai toxic reprezentant al acestei familii este *Laurus nobilis* (laurul). Produce moartea animalelor care consumă o cantitate mare de ţesut vegetal.

Plantele toxice ale acestei famili conţin *glicozide* toxice, cele mai abundente fiind *graianotoxina* (denumiri anterioare – *andromedotoxina*, *acetilandromedol* sau *rodotoxina*), o răşină volatilă înrudită cu terebentina şi *arbutin-glicozidul*.

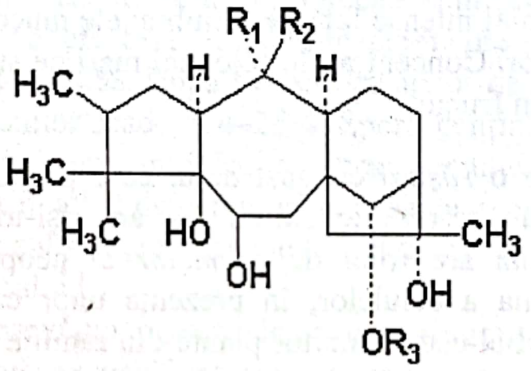
Compuşii sunt *diterpene* – hidrocarburi ciclice polihidroxilate, care nu conţin N.

*Graianotoxina*. Mierea din florile de rhododendroni şi azalee poate fi toxică, datorită toxicităţii polenului*. Intoxicaţia, a cărei intensitate diferă în funcţie de specia de plantă, este produsă de *graianotoxină*.

* Efectul toxic al polenului de *Rhododendron* este cunoscut cu circa 400 de ani î.C., când mierea era principala sursă de zahăr în Europa şi Asia. 10 0000 de soldaţi greci ai epocii sufereau de intoxicaţie, din cauza consumului prelungit de miere de *Rhododendron*. De atunci, intoxicaţia cu *Rhododendron* a fost confirmată în mod repetat.

Scanned with OKEN Scanner

Intoxicaţia se datorează consumului mierii produsă din nectarul de *Rhododendron*. Simptomele apar după o perioadă de latenţă a cărei durată depinde de doză: de ordinul minutelor, până la 3 ore sau mai mult: vertij, slăbiciune generală, perspiraţie excesivă, stare de rău general, vomă, parestezia extremităţilor (furnicături, amorţeli, care apar în unele afecţiuni ale sistemului nervos), scăderea presiunii sanguine, bradicardie sinusală. Dozele mari produc intoxicaţia acută, iar simptomele includ pierderea coordonării motorii, slăbiciune musculară severă şi progresivă, bradiaritmie, uneori tahicardie ventriculară. Intoxicaţia este rară, rareori fatală şi efectele nu durează mai mult de 24 de ore. Presiunea sanguină scăzută este asociată cu bradicardia sinusală. Pot să apară extrasistole (contracţii premature ale inimii, independente de ritmul normal, ca răspuns la un impuls ce vine din altă zonă a inimii decât nodul sinoatrial) şi tahicardie ventriculară (ritm ventricular crescut, datorită excitaţiei ventriculare crescute – peste 150/min).




| GRAY | $R_1$ | $R_2$ | $R_1R_2$ | $R_3$ |
|---|---|---|---|---|
| GRAY1 | OH | $CH_3$ | - | H |
| GRAY2 | - | - | $=CH_2$ | H |
| GRAY3 | OH | $CH_3$ | - | Ac |

Graianotoxina

La doze mici, graianotoxinele sunt neutralizate în tubul digestiv. De aceea, cazurile fatale sunt rare. Intoxicaţia cronică, datorată consumului prelungit de miere contaminată, produce salivaţie abundentă, stare de rău general, vomă, tulburări abdominale, scăderea presiunii arteriale şi a ritmului cardiac, cu ritm nodal atrioventricular, vertij cu pierderea echilibrului, dificultăţi respiratorii. Scăderea severă a presiunii sanguine se corectează prin administrarea lichidelor şi prevenirea bradicardiei: terapia cu substanţe vasopresoare (agenţi stimulatori ai contracţiei ţesutului muscular al vaselor sanguine). Bradicardia şi tulburările de conducere a potenţialelor de acţiune răspund la terapia cu atropină.

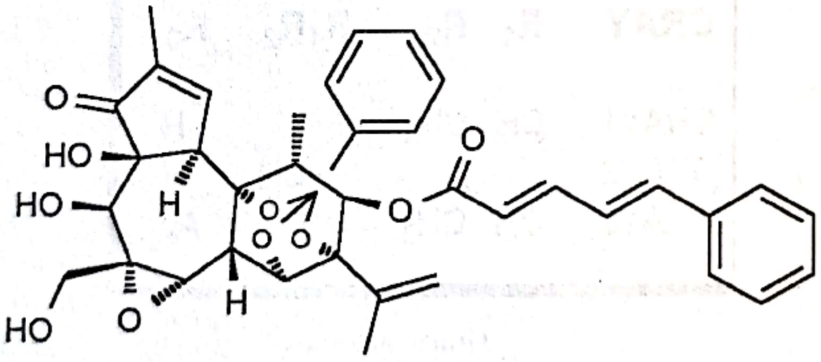
Scanned with OKEN Scanner

Graianotoxinele se leagă de o componentă a moleculelor membranare care au rolul de *canale de Na*, a căror activare şi inactivare este dependentă de potenţialul electric. Toxinele previn inactivarea canalelor de Na. Astfel, celulele excitabile (nervoase şi musculare) sunt menţinute într-o stare de depolarizare, în timpul căreia intrarea Ca în celule poate fi favorizată. Acţiunea este asemănătoare celei exercitate de alcaloizii din *Veratrum* şi *Aconitum*.

Toate animalele care consumă plantele de *Rhododendron, Azalea, Kalmia* etc. suferă intoxicaţii moderate. Toate organele plantei, dar în special frunzele, sunt toxice. Efectele toxice constau în iritarea mucoasei gastrice (la 6 ore după ingestie), durere abdominală, anomalii ale ritmului cardiac, convulsii, comă şi moarte în cazurile de intoxicaţie gravă. Toxina produce arsuri ale mucoasei bucale, ca şi terebentina, ceea ce descurajează consumul frunzelor.

*Daphne mezereum* (piperul lupului) este o plantă toxică. Toate ţesuturile plantei conţin substanţe iritante ce cauzează senzaţia de prurit, durere, arsură. Efectele toxice sunt mai intense faţă de membranele mucoase ale tractului digestiv, după ingestia fructelor. Concentraţiile cele mai mari de substanţe iritante se găsesc în scoarţă, în suc şi în fructe.

*Mezereina* este o *răşină* cu gust acru, care produce o iritare tegumentară intensă, iar *daphnina* este un glicozid cu gust amar şi toxic. Ambele sunt *alcooli diterpenici*. Mezereina are rolul de *promotor* al neoplaziei, adică favorizează transformarea malignă a celulelor, în prezenţa unor cantităţi mici de compuşi cancerigeni, ca şi forbol-esterii multor plante din familia *Euphorbiaceae*. Frunzele şi seminţele produc intoxicaţia mortală a calului şi porcului.




Structura moleculară a mezereinei

Masticaţia unui fruct de *Daphne mezereum*, chiar fără deglutiţie, produce senzaţia de arsură intensă a mucoasei bucale. Consumul câtorva fructe produce tulburări gastrice, dureri de cap, delir şi convulsii, posibil urmate de coma fatală.

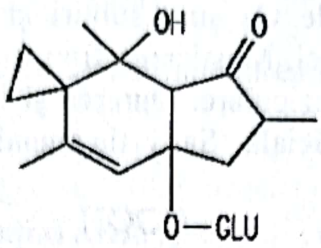
*Pteridium aquilinum* (feriga de câmp) şi *Equisetum palustre* (coada calului) conţin câteva substanţe toxice:

– *tiaminaza*, o enzimă care clivează vitamina $B_1$, pe care o inactivează. Efectul este deficienţa acesteia la nerumegătoare (cal, porc), care nu pot sintetiza propria vitamină. Deficienţa tiaminei duce la acumularea piruvatului în sânge,

Scanned with OKEN Scanner

cu diminuarea cantităţii de ATP; la rumegătoare, tiaminaza nu produce efecte clinice prin deficitul de tiamină, deoarece vitamina este sintetizată în rumen;

– *ptaquilozida*, abundentă în frunzele tinere, este un *glicozid* cancerigen-mutagen care produce simptome acute şi cronice la rumegătoare.




Ptaquilozida

În mediu alcalin, ptaquilozida este convertită la pterozina B, un cancerigen mutagen. Pterozina B este considerată ca agent cauzal al neoplaziilor după ingestie, iar ptaquilozida produce efecte toxice. Frunzele neprelucrate induc tumori la şobolan, cu o incidenţă de 78%. După fierbere cu adaos de NaCl sau bicarbonat de sodiu, incidenţa neoplaziilor scade la 4–25%. Sporii conţin substanţe toxice pentru om şi animale. Frunzele tinere sunt folosite în hrana omului, în special în Japonia şi conţin o cantitate semnificativă de carcinogen, ceea ce explică incidenţa crescută a cancerului gastric. Alte substanţe toxice ale ferigii de câmp sunt:

– *palustrina* – un alcaloid.

– *prunasina*, un *glicozid cianogen* toxic pentru ierbivore.

La ovine, intoxicaţia se manifestă prin prin degenerarea neuroepiteliului retinal.

## Toxicitatea mediată de oxalatul de calciu

*Anthurium, Caladium* (plante tropicale ornamentale), *Dieffenbachia, Philodendron, Narcissus* conţin o concentraţie mare de substanţe toxice în frunze, sub forma *oxalatului de Ca* şi a unor *toxine proteolitice* neidentificate sau *aminoacizi*, al căror efect este declanşarea eliberării histaminei din celulele* care o sintetizează şi o depozitează, în mediul intern după consumul frunzelor acestor plante.

* *Celulele* care sintetizează histamina sunt în primul rând *mastocitele* şi *bazofilele*.

Bazofilele sunt celule circulante, dar pot pătrunde în focarul inflamator. Mastocitele sunt celule mononucleate şi au două localizări principale:

– în ţesutul conjunctiv, în special în jurul vaselor sanguine din ficat, rinichi, splină;

– în mucoasele digestive şi cea respiratorie.

În citoplasma bazofilelor şi mastocitelor, la microscopul electronic se observă granule electrono-dense, ce reprezintă până la 40% din volumul celular. Ele conţin mediatori preformaţi, cei mai importanţi fiind *aminele biogene* (histamina şi serotonina). *In vivo*, histamina se sintetizează prin decarboxilarea histidinei, reacţie catalizată de histidin-decarboxilază (o enzimă citoplasmatică) şi este depozitată în granule. O celulă umană conţine 2–3 pg de histamină.

În creierul uman sunt două surse de histamină: *mastocitele* şi *neuronii histaminergici*.

Scanned with OKEN Scanner

Localizarea strategică a mastocitelor se corelează cu alterările patologice care se produc la nivel vascular gastrointestinal, bronşic, cutanat, cerebral, ocular, sub acţiunea agenţilor care stimulează eliberarea histaminei.

Histamina acţionează asupra unei varietăţi largi de tipuri celulare: celule musculare netede, neuroni, celule endocrine, exocrine, celule sanguine, celulele sistemului imunitar.

Cristalele de oxalat de Ca sunt subţiri şi ascuţite (aciforme), incluse în materialul gelatinos al frunzei. Masticarea frunzelor produce senzaţia de durere şi edemul mucoasei bucale, veziculare. Durerea şi iritaţia pot să persiste şi edemul este urmat de necroză superficială. Salivaţia abundentă este comună.

Acidul oxalic

Toate organele plantelor *Dieffenbachia, Philodendron* sunt toxice, dacă sunt consumate în cantitate mare.

La *Narcissus*, toate părţile plantei sunt toxice, dar bulbii au toxicitate superioară. După contactul tegumentar cu bulbii, cristalele de *oxalat de Ca* perforează epiderma şi produc leziuni caracteristice ale degetelor, un tablou sugestiv al eliberării histaminei.

Copiii şi animalele domestice sunt principalele victime ale intoxicaţiei, datorită aspectului atrăgător al florilor şi fructelor.

Oxalaţii produc tulburări digestive, dificultăţi respiratorii, iar dacă doza este mare, produc convulsii, comă şi moarte. Recuperarea este parţială, cu leziuni permanente hepatice şi renale.

*Caladium bicolor* produce iritarea şi senzaţia de arsură a mucoasei bucale şi labiale. Intoxicaţia este produsă de consumul frunzelor.

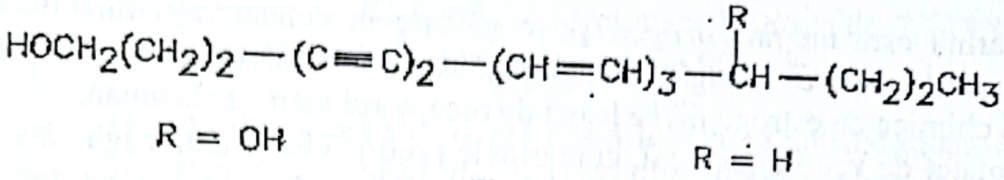
Cristalele de oxalaţi sunt comune la mulţi membri ai familiei *Araceae* şi efectele lor se caracterizează printr-o iritaţie intensă.

*Philodendron cordatum*, o plantă ornamentală de casă, produce intoxicaţia omului şi animalelor de casă, datorită *oxalaţilor*, dar cauzează o dermatită de contact.

*Rheum raponticum* (revent) este o plantă perenă cultivată, cu potenţial toxic pentru om, caprine şi suine. Conţine cristale de oxalaţi, care produc intoxicaţia după ingestia unor cantităţi mari de frunze proaspete sau preparate. Tulpinile au un conţinut mai mic de oxalaţi şi nu sunt toxice. Mai recent, s-a demonstrat şi implicarea antraquinonelor (glicozide) în procesele toxice.

*Cicuta maculata* (cucuta de baltă) este o plantă cu un potenţial toxic foarte înalt. Omul şi toate animalele domestice sunt sensibile la intoxicaţia cu *cicutoxină* şi după ingestie survine moartea. Simptomele sunt asemănătoare în toate cazurile de intoxicaţie: salivaţie abundentă, spasme musculare, convulsii violente, vomă, comă şi moarte prin asfixie. Toate organele plantei sunt toxice. Efectele toxice sunt produse de *cicutoxină* (cicutol), un *alcool superior* nesaturat.

Scanned with OKEN Scanner




Cicutol

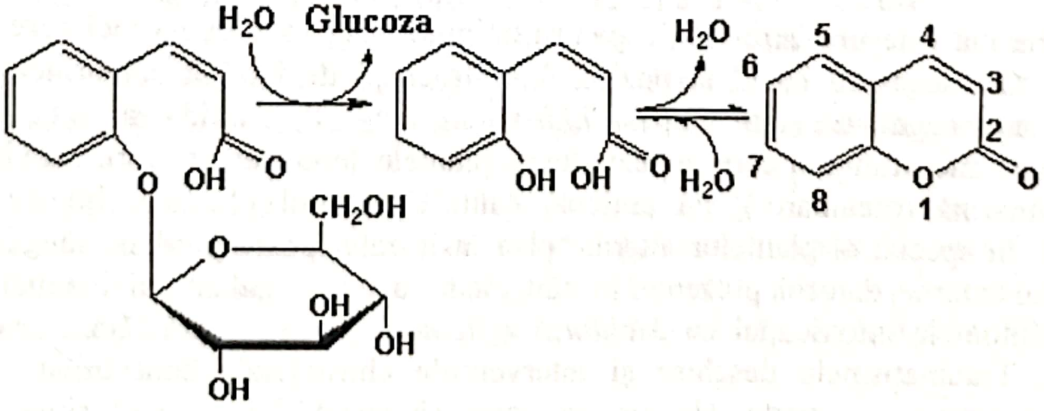
Ameliorarea stării toxice include administrarea cărbunelui, după care emeza încetează.

## Compuşi fenolici cu potenţial toxic

Compuşii fenolici sunt alcătuiţi din inele benzenice aromatice, cu unul sau mai multe grupări OH (C-OH). Este o clasă mare ce include numeroşi compuşi vegetali, care se deosebesc de terpene. Asemenea terpenelor, mulţi compuşi fenolici sunt legaţi de molecule de zahăr şi se numesc *glucozide* sau *glicozide*, în funcţie de tipul de zahăr. Cu cât sunt mai oxidaţi, cu atât sunt mai inhibitori pentru creşterea microorganismelor. Oxidarea compuşilor fenolici în pulpa fructelor şi în cartof, produce virarea culorii la brun sau negru. Chimic, compuşii fenolici sunt oxidaţi la *quinone*, care se combină repede într-un rest polimeric de culoare închisă. Pigmenţii de culoare închisă din celulele pigmentare ale unor plante (*Spirodela* şi *Wolfia*) sunt chinone polimerizate în celule.

*Glicozidele cumarinice* dau mirosul distinct de fân proaspăt cosit. Din punct de vedere structural, *cumarinele* sunt compuşi *fenolici* formaţi din inele fuzionate de benzen şi α-pironă.

*Cumarina* este o lactonă ce rezultă prin hidroliza enzimatică a unor *glicozide*, care se găsesc în frunzele şi tulpinile mai multor plante: *Lavandula* (levănţică), *Melilotus*, *Trifolium*, *Levisticum* (leuştean), căpşuni, caise, cireşe, scorţişoară etc. Cel mai cunoscut precursor al cumarinei este *melilotozidul* din *Melilotus altissima, Melillotus arvensis*. Melilotozida conţine un eter şi cumarina (fig. 54).




Melilotozid Cumarina

Fig. 54 – Ilustrarea schematică a hidrolizei melilotozidului la cumarină.

Scanned with OKEN Scanner

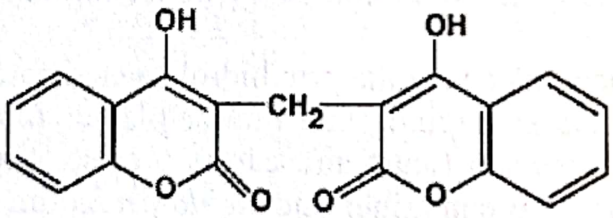
Cumarina este un *fitoestrogen* şi se găseşte în concentraţii mici în mulţi agenţi naturali care se adaugă alimentelor ca amelioratori de gust. Datorită asemănării chimice cu estrogenii, se leagă de receptorul estrogenic uman.

Din punct de vedere medical, cumarinele produc efecte anticoagulante, antitrombotice, hemoragice, antifungice, antiinflamatorii, vasodilatatoare şi antitumorale. Efectul anticoagulant este cel mai evident. Prin tehnicile de cromatografie s-au identificat mai multe variante chimice ale cumarinelor.

Cumarina se adaugă pentru mirosul plăcut în produsele cosmetice şi pentru parfumarea tutunului. A fost interzisă ca aditiv alimentar de FDA în 1940, datorită studiilor care au evidenţiat toxicitatea hepatică şi efectul anticoagulant.

Cumarina are un miros specific de vanilie şi „fân proaspăt". Are gust amar, ceea ce probabil a conferit un avantaj al plantelor în selecţia naturală. De exemplu, insectele fitosucivore evită gustul amar al cumarinei şi preferă alte plante. Ierbivorele au însă o capacitate redusă de percepţie a gustului amar şi consumul nu este limitat de acest factor.

Cumarina se eliberează din melilotozid sub acţiunea factorilor care deteriorează ţesuturile vegetale: uscare, îngheţ, însilozare, dar mai ales sub acţiunea fungilor. Creşterea microfungilor pe plantele de *Melilotus officinalis* depozitate este foarte probabilă, deoarece tulpinile sunt groase şi păstrează umiditatea. În încercarea de a păstra frunzele (subţiri în comparaţie cu tulpinile), plantele de *Trifolium, Melilotus* se depozitează înainte de uscare. Umiditatea este factorul favorizant al dezvoltării microfungilor.




Dicumarol

Cumarina este un factor toxic pentru animale. Derivaţii cumarinei care au grupul 4 -OH legat cu un C la poziţia 3 a structurii de bază a cumarinei, au activitate anticoagulantă şi se numesc *hidroxicumarine*. Prin oxidarea cumarinei sub acţiunea microfungilor care se dezvoltă pe plantele depozitate, se formează bis-hidroxicumarină (dicumarol), un anticoagulant. Consumul plantelor bogate în cumarină, în special al plantelor alterate prin însilozare, poate produce sângerări interne sau externe, datorită prezenţei în sângele lor a anticoagulantului dicumarol.

Simptomele intoxicaţiei cu *Melilotus officinalis* pot să apară fără o cauză evidentă. Traumatismele deschise şi intervenţiile chirurgicale sunt urmate de hemoragii severe şi moarte. Hemoragia poate să apară după o parturiţie fără complicaţii. Viţeii pot să moară în primele câteva zile dacă organismele materne au fost intoxicate.

Scanned with OKEN Scanner

Tratamentul cu vitamina $K_1$ s-a dovedit eficient în doza de 1,1–3,3 mg/kg corp, după intoxicaţia cu *Melilotus* care conţine minim 90 ppm.

Bis-hidroxicumarina a fost sintetizată şi s-a folosit ca anticoagulant oral sub denumirea de *dicumarol*. Produsul de sinteză folosit ca rodenticid s-a numit *warfarin* (*W*isconsin *A*lumi *R*esearch *F*oundation and *C*oumarin). Rodenticidele de generaţia a II-a (long acting anticoagulants) sunt caracterizate prin efecte de durată deoarece timpul de înjumătăţire este mult mai lung. Animalele intoxicate mor prin sângerare internă.

Rezultatele studiilor experimentale pe animale nu pot fi extrapolate totdeauna la om, datorită particularităţilor metabolice specifice. Se pare că derivaţii toxici ai cumarinei pot fi excretaţi în urină fără riscul intoxicării umane.

Produsele derivate din cumarină pot fi obţinute prin sinteză chimică sau din seminţele de *Dipteryx odorata* (familia *Fabaceae*).

*Patofiziologie*. Cumarina inhibă sinteza protrombinei, o proteină plasmatică sintetizată de ficat în prezenţa vitaminei K. Protrombina este precursorul trombinei, o enzimă ce catalizează conversia fibrinogenului la fibrină în procesul de coagulare. Filamentele de fibrină formează o reţea în aria leziunii vasculare, în care se găsesc plachetele şi hematiile. Cumarina este convertită în anticoagulantul *dicumarol*.

Vitamina K este un factor necesar pentru sinteza factorilor coagulării: II, VII, IX, X, precum şi a unor factori modulatori ai coagulării. Sinteza acestor factori este condiţionată de carboxilarea resturilor de acid glutamic din protrombină în ficat, o treaptă dependentă de vitamina K redusă. În reacţia de carboxilare, vitamina K este oxidată la *vitamina $K_2$, 3-epoxid*. 4-hidroxicumarinele blochează reductaza specifică a vitaminei K 2, 3-epoxid, necesară reducerii vitamnei K oxidate la forma ei activă. În absenţa vitaminei K reduse, se sintetizează factori nefuncţionali ai coagulării.

Biodisponibilitatea warfarinei este aproape completă după administrarea orală, intramusculară, intravenoasă sau rectală. Este absorbită total după 3 ore. 99% este legată de proteinele sanguine, în special de albumină. Efectele clinice ale warfarinei se manifestă la 24 de ore şi sunt maxime la 36–48 de ore.

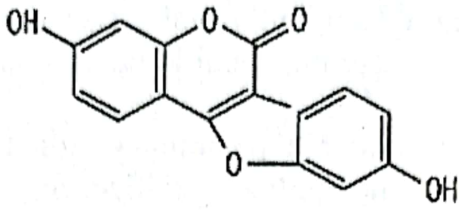
Pe lângă efectul anticoagulant, la concentraţii mai mari de 0,5% în dieta animalelor de laborator, cumarina induce carcinoame ale ductelor biliare. Dicumarina şi medicamentele înrudite se folosesc în medicina umană pentru fluidizarea sângelui.

*Medicago sativa* (lucerna) în faza de creştere conţine *proteine* care produc starea de flatulenţă a bovinelor şi ovinelor şi fotosensibilizarea bovinelor cu blană albă. Conţine *fitoestrogeni - cumestrol* şi *cumestan*, care produc infertilitatea rumegătoarelor şi *saponine** (acidul medicagenic) care diminuă rata creşterii şi producţiei de ouă la păsări.

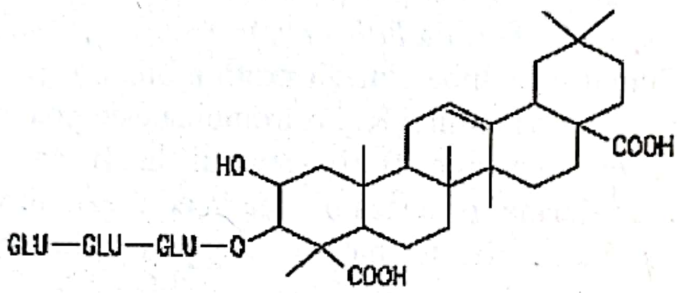
* Saponinele sunt o grupă importantă de glicozizi care au proprietatea de a forma o spumă abundentă şi persistentă într-o soluţie apoasă şi de a emulsiona grăsimile datorită proprietăţilor tensioactive. Prin hidroliză, glicozidele saponine produc o triterpenă sau sapogenină steroidă şi una sau

Scanned with OKEN Scanner

mai multe glucide (glucoză, galactoză, xiloză). Saponinele micşorează tensiunea de suprafaţă a soluţiei apoase şi formează dispersii coloidale în apă. Prin agitare produc spumă, ca un săpun. În formă de pulbere, saponinele s-au folosit ca agenţi spumanţi şi emulsionanţi. S-au folosit în extinctoarele cu agenţi spumanţi, în pasta de dinţi, săpunuri lichide, preparate cosmetice. Unele saponine pot irita mucoasele şi sunt hemolitice. Una dintre plantele cele mai bogate în saponine este *Chlorogalum*.




Cumestrol




Acidul medicagenic

*Glicozidele steroidice* – molecule care conţin un steroid şi o moleculă glucidică – sunt toxice pentru unele vertebrate, inclusiv pentru om. Sunt sintetizate de mai multe genuri de plante, inclusiv *Asclepias*. Sapogeninele steroidice rezultate prin hidroliza saponinelor glicozidice pot fi folosite ca materie primă pentru sinteza unor hormoni steroidici.

*Lignina* este un *polimer fenolic* ce conferă lemnului culoarea brună, densitate şi masă. Circa 40% din greutatea lemnului este lignină. Hârtia de calitate inferioară este de culoare brună deoarece conţine lignină. Pentru obţinerea hârtiei de calitate superioară, lignina este îndepărtată prin procedee chimice.

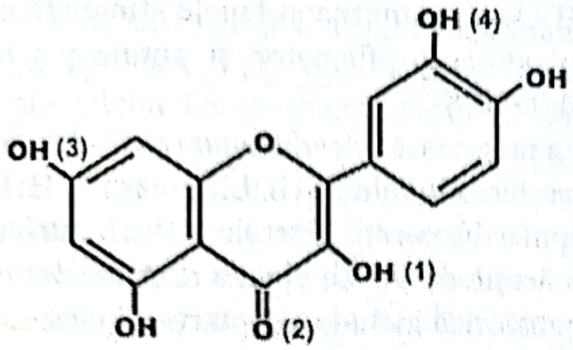
*Flavonoidele* sunt compuşi fenolici alcătuiţi din 3 cicluri: două condensate, legate printr-o legătură simplă de cel de al III-lea.

În frunză, flavonoidele au rol protector al macromoleculelor (acizi nucleici şi proteine) faţă de acţiunea distructivă a radiaţiei UV (pe care o absorb), dar lasă să treacă selectiv lumina albastră şi roşie, esenţială pentru fotosinteză.

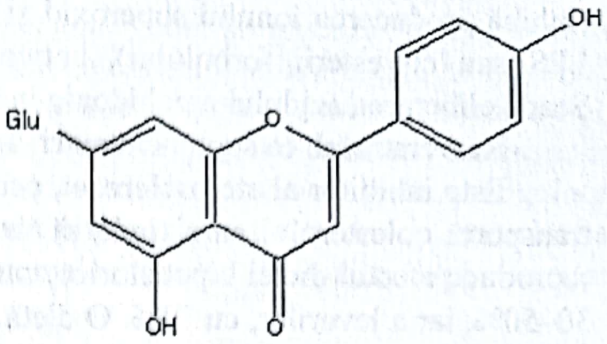
Flavonoizii hidrosolubili includ pigmenţii solubili în apă (antocianine) şi dau culorile vii de la roşu la albastru ale multor flori, în funcţie de pH-ul sucului apos din celulă.

Flavonoizii legaţi cu un rest de glucoză se numesc glucoflavonoizi sau glucozide, iar dacă glucidul nu este specificat, se numesc *glicozide flavonoidice*. Componentul flavonoidic fără zahăr se numeşte *aglicon*.

Scanned with OKEN Scanner




1. Îndepărtarea grupării OH: flavone
2. Înlocuirea grupării OH din poziţia 1, cu un al 3-lea inel: izoflavonă
3. Înlocuirea oxigenului din poziţia 2 cu un hidrogen: antocianină
   Înlocuirea grupării OH din poziţia 3, 4 sau 1 cu glucoza: glucozid

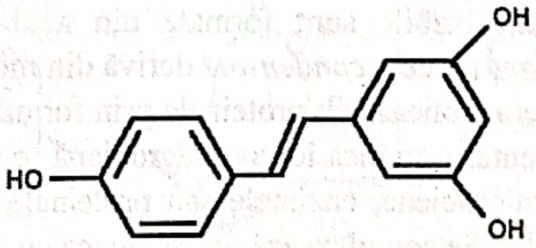



Apigenin-7 monoglucozid

Fig. 55 – Modelul general de structură al flavonoizilor.

Nutriţioniştii recomandă consumul flavonoizilor (din fructe, vegetale) pentru efectele lor benefice, în primul rând *antioxidante*.

Vinurile roşii din regiunile cu climat temperat conţin un *compus fenolic condensat*, denumit *resveratrol*. Resveratrolul are o structură moleculară asemănătoare cu a dietil-stilbestrolului, un estrogen sintetic. Proprietăţile estrogenice ale resveratrolului din tegumentul fructului viţei de vie produc efectele benefice cardiovasculare ale vinului roşu: inhibă procesul de aterogeneză.




Resveratrol

Resveratrolul aparţine familiei *fitoalexinelor*, pe care plantele îl sintetizează mai intens ca răspuns la acţiunea factorilor stresanţi (lipsa nutrienţilor sau infecţia fungică) şi are rol protector faţă de atacul fungilor patogeni şi insectelor. Resveratrolul se găseşte în coaja bobului de strugure alb şi negru, dar este de 10 ori mai concentrat în vinurile roşii decât în cele albe, datorită diferenţelor în procesul de producţie. Are rol protector al bobului de strugure faţă de infecţiile fungice. Vinul roşu conţine 0,6–0,8 μg/ml, iar coaja strugurelui proaspăt, 50–100 μg/g.

Consumul moderat al vinului roşu reduce riscul maladiilor cardiovasculare: resveratrolul diminuă agregarea plachetară şi tromboza vasculară, este antioxidant

(inhibă producerea ionului superoxid şi a $H_2O_2$ de către macrofagele stimulate cu LPS sau cu esterii forbolului), anticoagulant, anti-inflamator şi antineoplazic. Scade eliberarea acidului arachidonic indusă de LPS.

Resveratrolul, ca supliment nutritiv, este un extract de *Polygonum cuspidatum*.

Este inhibitor al aterosclerozei, prin creşterea nivelului HDL în plasmă. HDL transportă colesterolul care tinde să se depună în pereţii arterelor. Resveratrolul reproduce efectul dietei hipocalorice, care măreşte durata de viaţă a rozătoarelor cu 30–50%, iar a levurilor, cu 70%. O dietă hipocalorică include toţi nutrienţii necesari, dar are cu 30% mai puţine calorii decât dieta obişnuită.

Din seminţele de struguri (*Vitis vinifera*) se extrage un amestec bogat în *compuşi flavonoidici* (proantocianidine), care stimulează activitatea vitaminei C* printr-un mecanism sinergic necunoscut, reduc inflamaţia dureroasă a articulaţiilor şi împiedică oxidarea colesterolului, diminuând riscul aterogen.

* Vitamina C protejează celulele de efectele oxidante ale radicalilor liberi, prevenind acţiunea lor mutagenă.

O altă fitoalexină – *psoralenul* (din planta leguminoasă *Psoralea*), are o structură chimică asemănătoare cumarinei.

*Taninurile* sunt *polimeri fenolici* care se combină cu proteinele (colagenul) din pielea animalelor sau precipită gelatina din soluţie, proprietate denumită *astringenţă* şi formează compuşi stabili, rezultatul fiind *tăbăcirea*. Greutatea moleculară a taninurilor este cuprinsă între 500–3000 Da şi se găsesc în toate organele plantei: scoarţă, lemn, frunze, fructe, rădăcini. În funcţie de proprietăţile chimice, sunt grupate în *taninuri hidrolizabile* şi *taninuri condensate*.

Taninurile hidrolizabile sunt formate din acid galic sub forma esterilor multipli cu D-glucoza, iar cele *condensate* derivă din monomeri flavonoizi.

Taninurile interacţionează cu proteinele prin formarea legăturilor de H, a celor hidrofobe sau covalente. Acţiunea lor antimicrobiană se poate datora capacităţii de a inactiva adezinele microbiene, enzimele sau proteinele de transport din structurile superficiale ale celulei. Se complexează de asemenea cu polizaharidele.

Taninurile naturale, în Europa se obţin din *Tsuga*. În industria pielăriei, taninurile s-au înlocuit cu *dicromatul de sodiu*, cu acţiune asemănătoare.

*Quercus velutina* şi *Quercus rubra* conţin *taninuri* toxice, care produc intoxicaţii mortale la bovine şi cabaline. Frunzele şi ghinda sunt toxice. Taninurile sunt compuşi fenolici solubili în apă, alcool, acetonă şi precipită cu cele mai multe săruri. Greutatea moleculară este cuprinsă între 500–3000 Da.

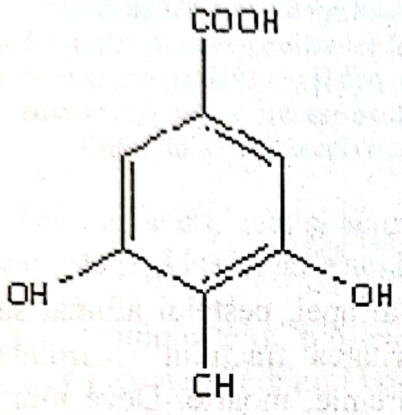
Taninurile prezintă două variante chimice: taninuri *hidrosolubile* şi *condensate* (proantocianidine).

Taninurile *hidrosolubile* sunt esteri care hidrolizează uşor, fiind formaţi dintr-o moleculă de zahăr (de obicei glucoza), legată de un număr variabil de molecule de acizi fenolici (*acidul galic* sau dimerul său, *acidul elagic*). Cele care prin hidroliză

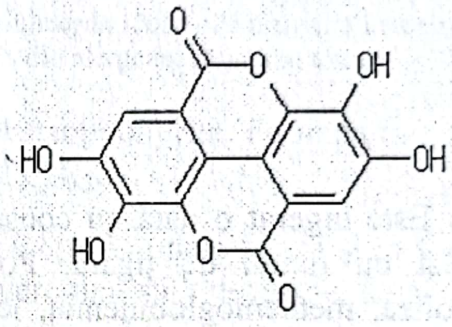
Scanned with OKEN Scanner

enzimatică sau acidă formează numai *acidul galic* şi glucoza sunt denumite *galotaninuri*. Se găsesc la plantele dicotiledonate. Prin distilare uscată se formează pirogalolul. Din acest grup fac parte taninurile din *Rosa gallica, Lythrum salicaria* etc.

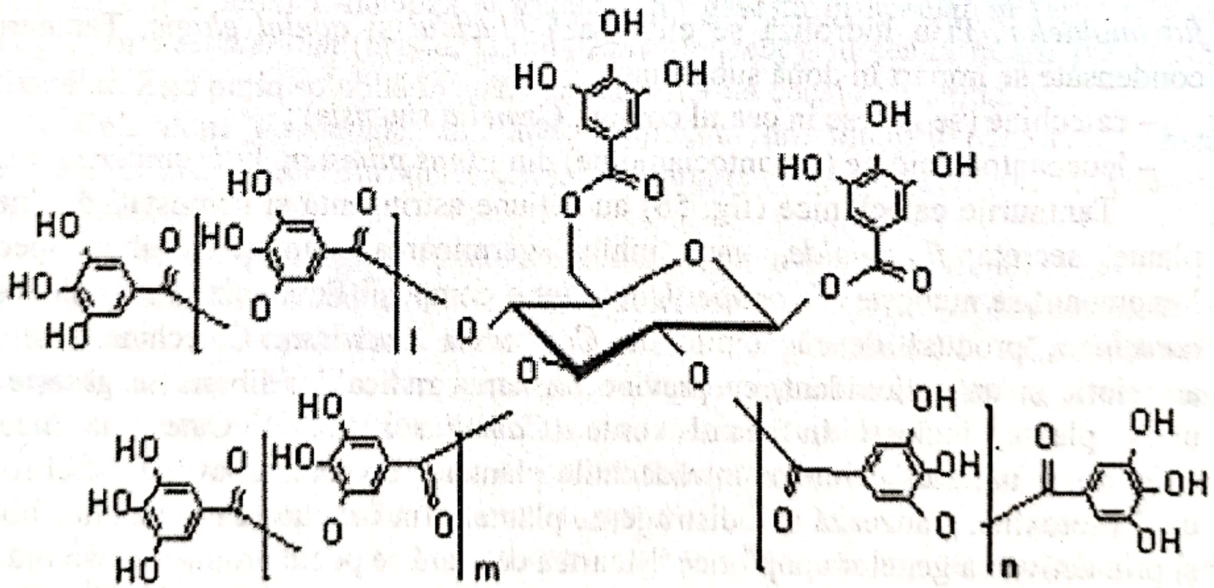
Ghinda şi frunzele de stejar (*Quercus*) imature conţin o cantitate mai mare de substanţe toxice. Compuşii toxici sunt polihidroxifenolici: *acidul galic, pirogalolul* şi *acidul tanic*. Cantităţile toxice de ghindă produc depresie, anorexie, constipaţie, sângerare a mucoasei colonului. Simptomele apar în 6–9 zile după ingestie. Moartea survine prin insuficienţă renală.




Acid galic




Acid elagic



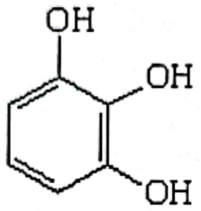

$1 + m + n = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$

Acidul tanic

*Acidul tanic* (acid galotanic, acid digalic, tanin) este un acid organic monobazic, care se obţine din gale. Acidul tanic interacţionează cu proteinele, inclusiv cu gelatina şi le precipită. Pe această proprietate se bazează utilizarea sa în

tăbăcirea pieilor de animale. Soluţia de acid adăugată la albumină sau gelatină produce un precipitat dens, solubil în exces de albumină sau gelatină şi în acizi sau în baze. Acidul tanic liber este astringent, dar după neutralizare cu albumina sau cu baze, proprietăţile astringente se pierd. În stomac, cu albumina formează tanaţi. Datorită proprietăţii coagulante, diminuă secreţia digestivă. Este folosit ca antidot în intoxicaţia cu macromicete, cu toxinele micromicetelor şi cu stricnină.

*Pirogalolul* este un produs secundar al descompunerii substanţelor humice şi se poate găsi în sursele de apă din zonele bogate în materie organică.




Pirogalol

Este ingerat o dată cu consumul ceaiului, al apei, peştelui afumat sau este inhalat cu fumul de ţigară. Poate produce iritarea tractului gastrointestinal, hemoliza, methemoglobinemia, leziuni renale, uremie, moarte. Doza mortală de pirogalol pentru om este de 143 mg/kg.

Taninurile *condensate* (nehidrolizabile) au o structură chimică asemănătoare *flavonoidelor*. Prin hidroliză se eliberează *glucidul* şi *acidul elagic*. Taninurile condensate se împart în două subgrupe:

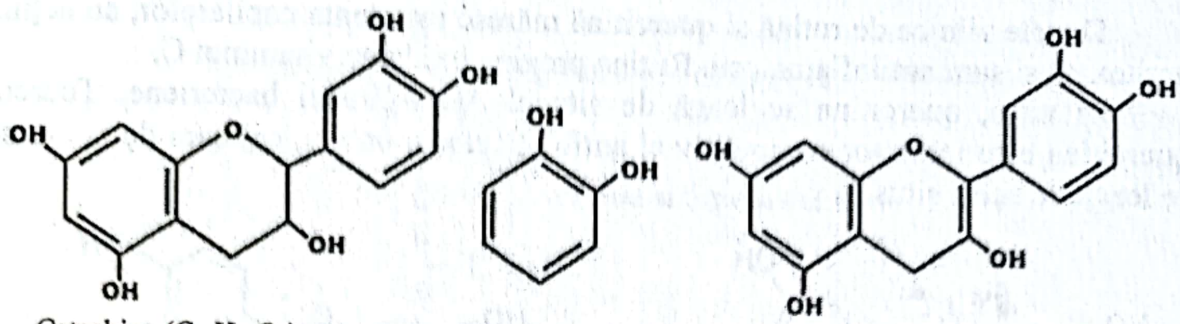
– catechine (se găsesc în ceaiul comun, *Camelia sinensis*) ;
– leucoantocianidine (proantocianidine) din *Pinus pinaster, Vitis vinifera*.

Taninurile catechinice (fig. 56) au acţiune astringentă şi hemostatică. Unele plante secretă *flavonoide*, care inhibă germinarea seminţelor altor specii. Fenomenul se numeşte *alelopatie*. Unul dintre compuşii flavonoizi alelopatici este *catechina*, produsă de rădăcinile de *Centaurea maculosa*. Catechina este un antibiotic şi un antioxidant, ce previne formarea radicalilor liberi. Se găseşte în unele plante, inclusiv în ceaiul verde (*Camellia sinensis*). Catechina induce oxidarea şi moartea celulelor în rădăcinile plantelor învecinate, având astfel rolul unei fitotoxine. Cauzează autodistrugerea plantei prin producerea radicalilor liberi şi prin activarea genelor apoptotice. Moartea celulară se poate produce într-o oră de la expunerea la catechină.

Catecolul (2 grupări OH) şi pirogalolul (3 grupări OH) sunt fenoli hidroxilaţi, inhibitori ai creşterii microorganismelor. Efectul inhibitor al compuşilor fenolici se corelează cu numărul grupărilor OH.

Mecanismele prin care compuşii fenolici produc efecte toxice asupra microorganismelor sunt: inhibiţia activităţii enzimelor, probabil prin reacţia cu grupările –SH, interacţiuni nespecifice cu proteinele.

Scanned with OKEN Scanner



Catechina ($C_{15}H_{14}O_6$) Catecol ($C_6H_6O_2$) Antocianina ($C_{15}H_{12}O_6$)

Fig. 56 – Structura chimică a *catechinei* este foarte asemănătoare cu a pigmentului floral *antocianina*. Inelul din mijloc al catechinei nu are legătură dublă şi are doi atomi de H în plus. Catechina are două forme chirale: una pozitivă (+) şi una negativă (-). Catechina (+) este un antioxidant din ceaiul verde, iar catechina (-) induce procese oxidative şi moartea celulelor în rădăcinile plantelor învecinate. Catecolul (pirocatecol) este un compus caustic din alergenul stejarului toxic.

Taninurile din ceai şi acidul tanic sunt substanţe diferite. Formula taninurilor din ceai este $C_{20}H_{20}O_9$, iar a acidului tanic este $C_{14}H_{10}O_9$.

*Quercitina* este un bioflavonoid care se găseşte în unele fructe şi în frunzele diferitelor legume. Cele mai bogate surse de quercitină sunt ceaiul verde şi negru, mărul, ceapa, fasolea şi vinul roşu. Este insolubilă în apă.

*Rutina* este quercitina glicozilată cu dizaharidul rutinoză. Rutinoza este formată din 6-deoxi L-manoză şi glucoză. Se găseşte în special în seminţele de *Fagopyrum esculentum* (hrişcă, familia *Polygonaceae*), în ceaiul negru şi în coaja fructelor. Este puţin solubilă în apă, dar mai solubilă decât quercitina.

Cele două *flavonoide* sunt antioxidante, antiinflamatorii (deoarece inhibă eliberarea histaminei din mastocite), anticarcinogene, antitrombotice, cito- şi vasoprotectoare.

Activitatea biologică fundamentală a acestor compuşi fenolici este cea *antioxidantă*: elimină radicalii superoxid. Celelalte activităţi derivă din proprietatea antioxidantă. Pot chela ionii metalici, aşa cum sunt cationii $Fe^{2+}$. Cationii $Fe^{2+}$ participă la reacţia Fenton, care generează radicalii reactivi ai $O_2$. Rutina favorizează menţinerea nivelului glutationului redus, cu funcţie antioxidantă.

Activitatea antioxidantă se datorează componentei agliconice – quercitina, care rezultă prin hidroliza rutinei după ingestie.

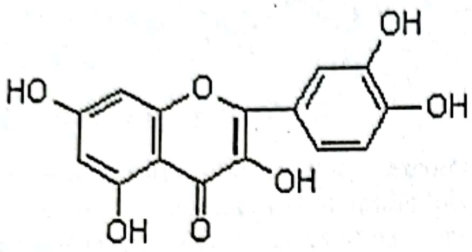
În anumite condiţii, rutina sau quercitina pot favoriza procesele oxidative. De exemplu, nitrozarea (combinarea cu gruparea NO) rutinei sau quercitinei produce o moleculă peroxidantă cu potenţial mutagen.

Rutina este absorbită în special la nivelul colonului, în proporţie de 17%, după hidroliza componentei glucidice sub acţiunea enzimelor microbiotei intestinale. În celulele mucoasei colonului, quercitina poate fi conjugată cu acidul glucuronic (glucuronidată). În plasmă, quercitina se asociază cu albumina. Conjugatul glucuronidic şi quercitina nativă sunt transportate pe cale portală în ficat, unde sunt metabolizate. Derivaţii metabolici sunt eliberaţi în circulaţia generală.

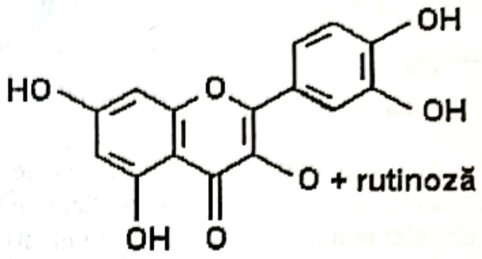
Scanned with OKEN Scanner

Dozele zilnice de rutină şi quercitină măresc rezistenţa capilarelor, au acţiune antitoxică şi sunt antiinflamatorii. Rutina previne oxidarea vitaminei C.

*In vitro*, quercitina se leagă de situsul ADN-girazei bacteriene. Teoretic, quercitina este inhibitor competitiv al antibioticelor quinolonice, care de asemenea se leagă de acest situs.



Quercitina



Rutina

*Quinonele* sunt inele aromatice cu două grupări cetonice, ubicvitare în natură. Sunt compuşi coloraţi, care produc brunificarea pulpei fructelor şi vegetalelor. Sunt intermediari în sinteza melaninei în tegumentul uman. Comutarea între difenol (hidroquinonă) şi dicetonă (quinonă) se face uşor, prin reacţia de oxidare şi reducere.

Chinona

Potenţialul redox individual al unui cuplu quinonă-hidroquinonă este foarte important în multe sisteme biologice: ubiquinona (coenzima Q) este componentă a catenei de transport al electronilor (vezi fig. 57).

Vitamina K este o naftoquinonă complexă. Activitatea antihemoragică s-ar putea datora uşurinţei cu care este oxidată în ţesuturi.

*Tetrahidrocanabinolul* (THC) este un *compus fenolic* din perii glandulari (trichoame) de pe inflorescenţele şi bracteele florilor feminine ale plantei marijuana (*Canabis sativa*). Marijuana pură din *Cannabis sativa* este un amestec de substanţe psihotrope mono- şi sesquiterpene, împreună cu circa 30 de compuşi fenolici. *Componenta activă* majoră – *tetrahidrocanabinolul* (THC) constă din subunităţi terpen* şi fenolice (compus terpenofenolic).

* Compuşii terpenici (terpenoide) sunt hidrocarburi de origine vegetală, cu formula generală ($C_5H_8$-izopren)n care se împart în *monoterpene* ($C_{10}H_{16}$), *sesquiterpene* ($C_{15}H_{24}$), *diterpene* ($C_{20}H_{32}$), *triterpene* ($C_{30}H_{48}$) şi *tetraterpene* ($C_{40}$). În cazul în care compuşii conţin elemente suplimentare, de obicei oxigen, se numesc *terpenoizi*.

Hidrocarburile macromoleculare (cauciucul, gutaperca) sunt *politerpeni* ($C_5H_8$)n. Studiile experimentale la şobolan nu au evidenţiat activitate carcinogenică a acestor compuşi. La şoarecii masculi s-a înregistrat o incidenţă crescută a hiperplaziei celulelor foliculilor glandei tiroide şi a ulcerelor gastrice.

Scanned with OKEN Scanner

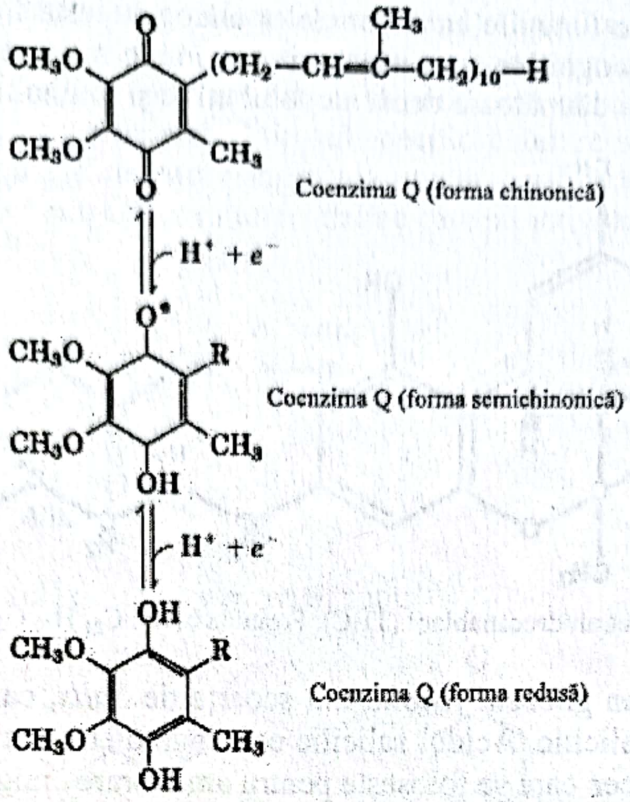



Fig. 57 – Ciclul redox al coenzimei Q.

Deoarece conţine grupări OH, din punct de vedere chimic, THC este un alcool. Nu conţine N şi nu este compus alcaloidic.

Terpenoizii sunt sintetizaţi ca unităţi de acetat, ca şi acizii graşi, dar diferă de aceştia pentru că sunt ramificaţi şi ciclizaţi.

Proprietăţile psihoactive ale marijuanei au fost exploatate iniţial în India. THC se găseşte într-o răşină de culoare galbenă din florile plantei *Cannabis sativa (Cannabis indica)*. Haşişul de calitate superioară poate să conţină până la 50% THC pur. Plantele cu producţie maximă de THC sunt cele de sex feminin, care cresc în zonele calde, cu expunere solară, în absenţa plantelor mascule*.

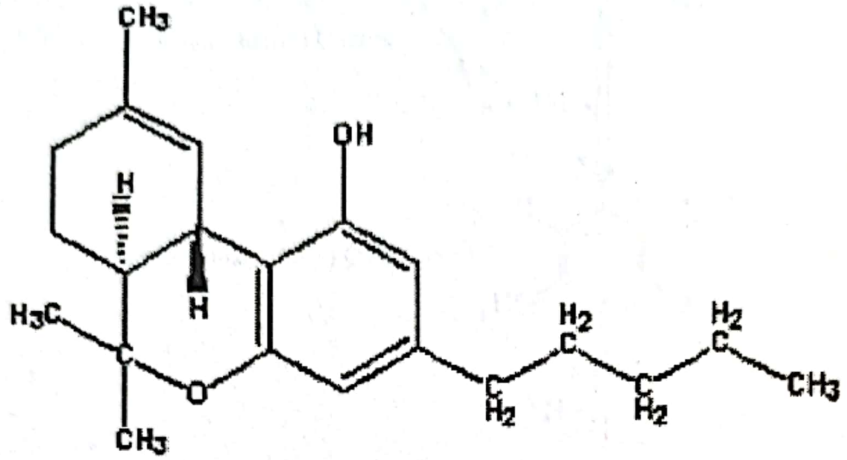
* Termenul *sinsemilla* (fără seminţe) se referă la plantele femele nepolenizate, nefertilizate, fără seminţe.

Pe pistilul florilor se găsesc numeroşi peri glandulari, cu o picătură de răşină la vârf. Răşina conţine un amestec de sesquiterpene volatile şi monoterpene, alături de câţiva compuşi fenolici. Sunt plante femele fără seminţe, pentru că nu se polenizează. Pentru fumatul ocazional şi pentru scopuri medicale se folosesc florile şi bracteele.

Marijuana reduce starea de rău a pacienţilor neoplazici, consecutivă administrării agenţilor chimioterapeutici sau radiaţiilor. THC dilată vasele bronşice şi ameliorează crizele astmatice, hipertensiunea şi reduce tensiunea în ochiul glaucoma.

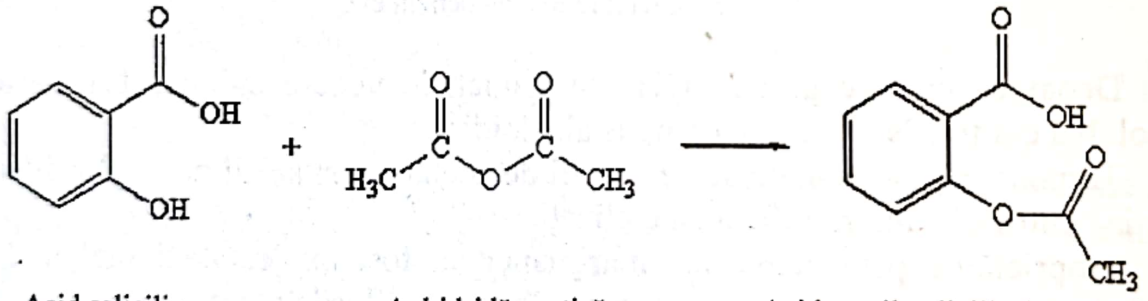
Marijuana este psihotropă: THC se leagă de receptorii specifici ai neuronilor şi determină intoxicarea. Interferă cu procesele de memorizare de lungă durată din

hipocamp (una dintre funcţiile canabinoidelor endogene este favorizarea amneziei selective). Funcţiile cognitive sunt adeseori deteriorate moderat şi reversibil. Este considerată mai puţin dăunătoare decât alcoolul etilic şi tutunul.



Tetrahidrocanabinol (THC). Formula brută: $C_{21}\ H_{30}\ O_2$

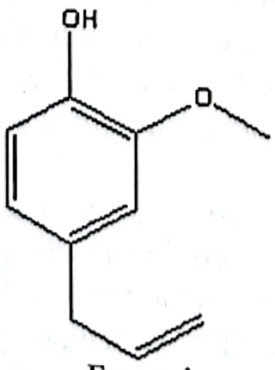
*Salicina* este un *glicozid fenolic* din scoarţa de *Salix*, care în organism este hidrolizată în acid salicilic. Acidul salicilic este ingredientul utilizat pentru sinteza chimică a aspirinei, cea care se foloseşte pentru ameliorarea migrenelor (fig. 58).



Acid salicilic — Anhidridă acetică — Acid acetil-salicilic (aspirina)

Fig. 58 – Reacţia de sinteză a aspirinei.

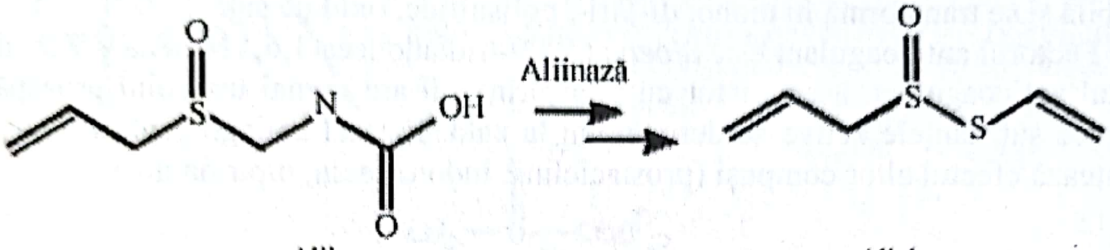
Compuşii fenolici cu un nivel inferior de oxidare, care au o catenă laterală $C_3$ fără oxigen, sunt clasificaţi ca uleiuri şi au proprietăţi antimicrobiene. *Eugenolul* din *Alium sativum* are efecte bacteriostatice şi fungistatice.



Eugenol

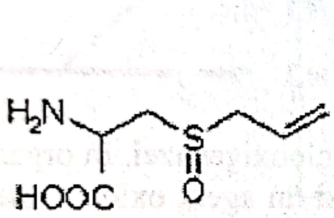
Scanned with OKEN Scanner

*Alium sativum* (usturoiul) şi *Alium cepa* (ceapa) (Familia *Lilyaceae*) conţin substanţe aromatice şi sunt folosite ca agenţi de aromatizare ai alimentelor. Principiul aromatic din *Alium sativum* este o terpenă care conţine S. Un bulb de usturoi intact are miros specific slab. Mirosul specific puternic se resimte după ce bulbul este tăiat sau strivit, deoarece molecula precursoare fără miros – *aliina* – este convertită la *alicină* sub acţiunea unei enzime care se activează.

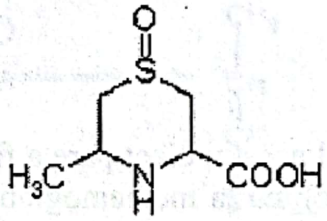



Aliina Alicina

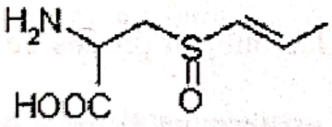
Alţi compuşi cu sulf din *Alium sativum* sunt:



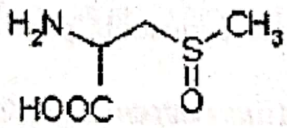
Aliina



Cicloaliina

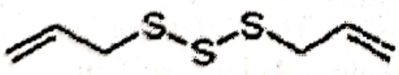


Izoaliina

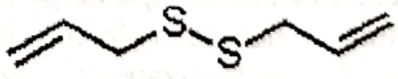


Metiina

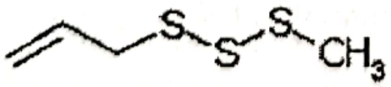
Mirosul neplăcut al respiraţiei după ingestia usturoiului se datorează derivaţilor metabolici ai alicinei, care conţin S:



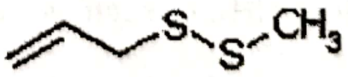
Dialil-trisulfid



Dialil-disulfid



Alil metil-trisulfoxid



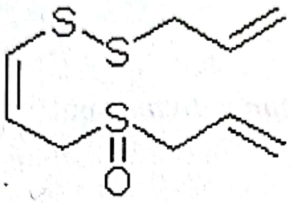
Alil metil disulfid

Substanţele organosulfurice din *Alium sativum,* în special alicina şi metaboliţii derivaţi au următoarele proprietăţi farmacologice: sunt antiseptice, anticoagluante

şi antiagregante (diminuă agregarea plachetară), antitensive, fibrinolitice, diminuă riscul aterosclerozei prin scăderea nivelului lipidelor şi colesterolului sanguin, favorizează regresia plăcii ateromatoase. *In vitro*, în hepatocitele de şobolan, usturoiul inhibă înglobarea acetatului şi interferă cu sinteza colesterolului. Acest mecanism nu s-a demonstrat la om. Efectul antitensiv este insuficient dovedit.

După consumul usturoiului, alicina nu se regăseşte în sânge, deoarece este instabilă şi se transformă în mono, di-, tri-, polisulfide, oxid de sulf.

Factorul anticoagulant este *ajoena* (4,5,9-tridiadodeca-1,6,11-triena – 9 oxid). Efectul anticoagulant, asemănător cu al aspirinei, îl are numai usturoiul proaspăt, deoarece substanţele active se descompun la cald. Efectul antiagregant al ajoenei potenţează efectul altor compuşi (prostaciclina, indometacin, dipiridamol).



Ajoena

Mecanismul acestui efect pare a fi calea ciclooxigenazei. În organism, ajoena oxidează hemoglobina la methemoglobină. Fiind un agent oxidant puternic, aliina protejează usturoiul de atacul microorganismelor şi al insectelor, acţionând ca un insecticid natural. Atacă grupările –SH ale enzimelor care favorizează invazia şi infecţia bacteriană

*Alium cepa* este cunoscută pentru efectul lacrimogen produs de *propanetial-S-oxid.*

Alicina din *Alium cepa* ($C_6H_{10}OS_2$) este o substanţă lichidă, uleioasă şi dă mirosul caracteristic datorită grupării SO. Alicina este un compus foarte reactiv. Este uşor solubilă în apă şi în alcool.

În prezenţa aerului, aliinazele degradează unele substanţe – ca aminoacid-sulfoxizii, eliberaţi din celule şi se formează acizii sulfenici, volatili. Substanţele volatile reacţionează cu apa de pe suprafaţa globului ocular şi rezultă $H_2SO_4$ care irită terminaţiile nervoase ale conjunctivei oculare, stimulând secreţia lacrimală ca mecanism de neutralizare a substanţei iritante. Acizii sulfenici formează tiosulfinaţii care dau mirosul caracteristic al cepei.

Aliina şi profenil-aliina sunt hidrolizate la acid alil-sulfenic, profenil-sulfenic, acid piruvic şi $NH_3$, sub acţiunea aliinazei, când usturoiul sau ceapa sunt tăiate sau strivite.

Acidul alil-sulfenic se condensează spontan la dialilsulfid şi alicină. Aceste substanţe au activitate antimirobiană puternică.

Acidul profenil-sulfenic se rearanjează spontan la *sin-propanetial-S-oxid*, substanţa care produce lăcrimarea.

Alicina şi sin-propanetial-S-oxidul sunt repelente faţă de insecte (fig. 59).

Scanned with OKEN Scanner

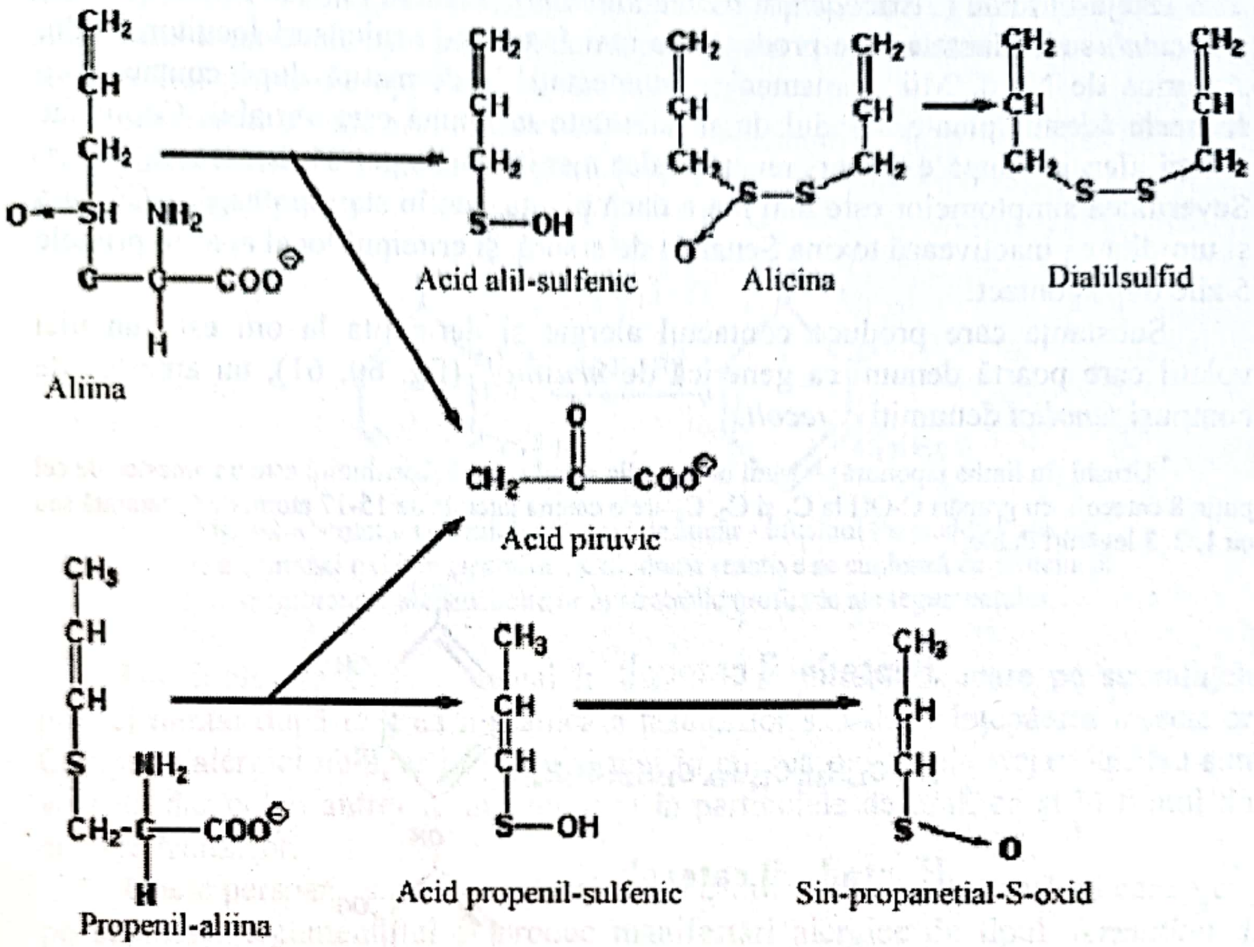



Fig. 59 – Reacţiile catalizate de aliinază care au loc în prezenţa aerului.

## Substanţe iritante care produc leziuni tegumentare

Plantele familiei *Compositae* conţin compuşi chimici – *lactone sesquiterpenice* – cu acţiune sensibilizantă şi iritantă.

*Dermatita alergică de contact*, spre deosebire de dermatita produsă de factorii iritanţi, are substrat imunitar şi necesită starea de sensibilizare* anterioară indusă de contactul primar cu agentul chimic.

* Contactul primar cu antigenul creează, uneori, *o stare de sensibilizare* faţă de antigenul respectiv. Sensibilizarea este o stare fiziologică dăunătoare organismului şi se manifestă, în special după contactul organismului cu antigene proteice (din ou, din ser), cu antigenele din polen şi cu diferiţi compuşi din ţesuturile vegetale. La *contactul secundar* cu antigenul sensibilizant, organismul răspunde prin *stările patologice de hipersensibilitate*.

Manifestările reacţiei se exteriorizează în 48 de ore şi se manifestă prin eritem, care poate să persiste câteva săptămâni. Reacţia este produsă de substanţele toxice din stejar şi din iederă. Se formează eczeme uscate şi pruriginoase. Floricultorii alergici la *Tulipa* şi *Alstroemia* pot să facă reacţii severe la contactul cu bulbii sau cu florile acestor plante.

Scanned with OKEN Scanner

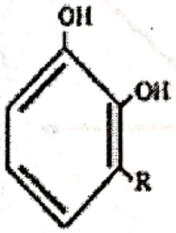
Stejarul toxic (*Toxicodendron diversilobum*) şi iedera toxică (*Toxicodendron radicans*) sunt plantele care produc cele mai frecvente neajunsuri locuitorilor din America de Nord. Mii de oameni sunt afectaţi de dermatită după contactul cu frunzele acestor plante. Gradul de sensibilitate la toxină este variabil. Copiii fac reacţii alergice după expuneri repetate, dar manifestările pot să dispară cu vârsta. Severitatea simptomelor este mai mare dacă planta este în stare proaspătă. Căldura şi umiditatea inactivează toxina Senzaţia de arsură şi eritemul local apar în primele 5 zile după contact.

Substanţa care produce contactul alergic şi dermatita la om este un ulei volatil care poartă denumirea generică de *urushiol** (fig. 60, 61), un amestec de compuşi *fenolici* denumiţi *catecoli*.

* Urushi (în limba japoneză) = lacul obţinut din sucul plantei. Urushiolul este un amestec de cel puţin 8 catecoli, cu grupări C-OH la $C_1$ şi $C_2$. $C_3$ are o catenă laterală de 15-17 atomi de C saturată sau cu 1, 2, 3 legături duble.

**Pentadecil catecol:**

R = $C_{15}H_{31}$, $C_{15}H_{29}$, $C_{15}H_{27}$, $C_{15}H_{25}$




**Heptadecil catecol:**

R = $C_{17}H_{35}$, $C_{17}H_{33}$, $C_{17}H_{31}$, $C_{17}H_{29}$

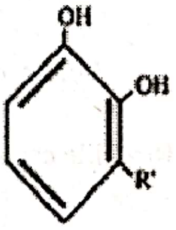



Fig. 60 – Structura chimică a compuşilor urushiol care se găsesc în canalele rezinifere ale stejarului toxic şi iederei toxice. Toxina din iederă conţine în special, un amestec de 4 pentadecilcatecoli cu catenă laterală de 15 atomi de C, iar toxina de stejar conţine un amestec de 4 heptadecilcatecoli, cu catenă laterală de 17 atomi de C.

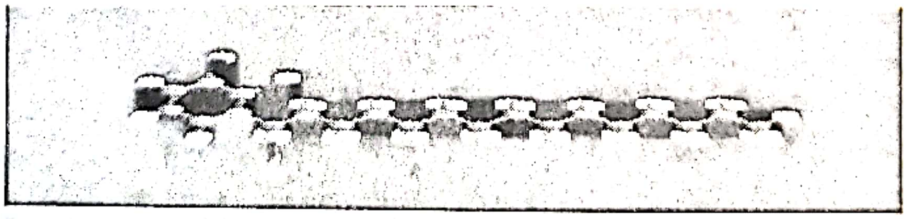


Fig. 61 – Structura chimică a pentadecilcatecolului saturat, unul dintre catecolii din canalele rezinifere ale iederei toxice.

În funcţie de specie, urushiolul este un amestec de cel puţin 8 catecoli, compuşi *fenolici*, cu grupări C-OH la $C_1$ şi $C_2$. $C_3$ are o catenă laterală de 15 sau 17 atomi de C, saturată sau cu 1, 2 sau 3 legături duble. Urushiolul este oxidat la o *quinonă*, după ce penetrează epiderma tegumentară. Quinona oxidată este mai reactivă, având rolul unei haptene autocuplante şi formează conjugate cu proteinele

Scanned with OKEN Scanner

tisulare, în care catena laterală are rolul unui epitop specific. Ţinta principală este membrana leucocitelor. Se iniţiază un răspuns imun complex mediat de celule, care se manifestă printr-o erupţie locală veziculară eritematoasă.

Compusul din stejarul toxic conţine catecoli cu catene laterale de 17 atomi de C (heptadecilcatecoli), iar iedera toxică conţine catene cu 15 atomi de C (pentadecilcatecoli) (fig. 62).

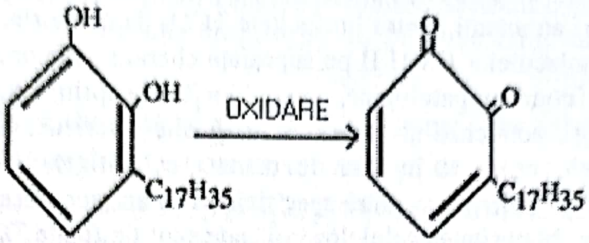



Fig. 62 – Structura chimică a toxinei de stejar - urushiol (heptadecilcatecol) şi a chinonei oxidate „reactive". Chinonele reactive se cuplează cu proteinele membranare ale leucocitelor în straturile profunde ale tegumentului.

Urushiolul se găseşte numai în canalele rezinifere şi apare pe suprafeţele plantei numai după lezarea mecanică a ţesuturilor sau după înţepătura insectelor. Compuşii alergici nu apar în polen şi nici în mierea din florile stejarului. Nu sunt volatili, dar pot fi antrenaţi în cenuşa şi în particulele de praf, ca şi în fumul din arderea frunzelor.

Unele persoane sunt foarte sensibile la cantităţile urmă de urushiol care ajung pe suprafaţa tegumentului şi produc manifestări alergice de tipul *dermatitei de contact**. La o persoană hipersensibilă sunt suficiente 2 μg de urushiol pentru iniţierea reacţiei.

* Hipersensibilitatea de contact, la om, se prezintă ca o *inflamaţie a tegumentului*, adică o leziune tegumentară cu eritem, edem moderat şi distrugerea epiteliului la locul de contact cu alergenul. Reacţia este maximă la 48–72 de ore după contactul secundar.

Dermatita alergică de contact este o formă de HS de contact şi este rezultatul sensibilizării limfocitelor. Unele haptene (dinitroclorbenzenul) sensibilizează aproape toţi indivizii umani.

Reacţia de HS de contact se desfăşoară în două faze:

1) *Faza de sensibilizare* (faza contactului primar). Moleculele mici (mai mici de 500 D) de orice proveniență, traversează tegumentul şi se leagă covalent sau necovalent cu proteine tisulare constitutive, în special cu colagenul, prin gruparea $NH_2$ a lizinei. Astfel, se formează un *conjugat haptenă-proteină*, recunoscut de sistemul imunitar al tegumentului. Celulele Langerhans, localizate în straturile suprabazale ale epidermei sunt principalele celule prezentatoare ale antigenului. Ele exprimă la nivel membranar, molecule CMH II, precum şi receptori pentru regiunea Fc şi pentru componentele complementului. În faza de sensibilizare, celulele Langerhans transportă conjugatul antigenic, fie internalizat, fie asociat membranei, de la nivelul tegumentului, în ganglionii limfatici regionali.

Antigenul sensibilizant este recunoscut de limfocite $TCD_4$ neangajate (naive). Ele se activează la distanţă de locul pătrunderii antigenului, în ganglionii limfatici regionali. Celulele T sunt prezente în tegument (şi în alte ţesuturi), în număr nesemnificativ, dar în ganglioni, contactul celulelor T cu celulele prezentatoare de antigen este foarte mult uşurat de densitatea mare a ambelor tipuri celulare. În răspunsul imun primar, stimularea celulelor T poate să nu fie evidentă, deoarece se produce în ganglioni şi nu la locul contactului cu antigenul. Celulele T neangajate, de dimensiuni mici se

activează, se produce expansiunea clonală şi diferenţierea în celule efectoare şi celule de memorie cu specificitate faţă de haptenă. Numărul lor creşte cu câteva ordine de mărime. Din ganglion, celulele T sunt diseminate în sângele periferic, iar de aici, probabil prin homing specific, în tegument la situsul de contact cu antigenul, unde eliberează citochine.

Între contactul sensibilizant şi al doilea contact este necesar un interval de 10–14 zile.

2) *Reacţia propriu-zisă* se produce după al doilea contact cu alergenul şi se exprimă ca o dermatită. După stimularea secundară, se produce inflamaţia deschisă a pielii (leziunea tegumentară).

Celulele Langerhans care au legat conjugatul haptenă-proteină, se deplasează din epiderm spre derm şi secretă mediatori atractanţi pentru limfocitele $TCD_4$ de memorie. Acestea secretă IFN γ, care determină exprimarea moleculelor CMH II pe suprafaţa cheratinocitelor şi a celulelor endoteliale ale capilarelor dermice. În condiţii patologice, cheratinocitele exprimă molecule CMH II şi pot să prezinte antigenul. Ele se activează şi secretă IL-1 şi alte interleuchine. IL-1 stimulează celulele Langerhans şi limfocitele infiltrate în aria de contact cu antigenul. Interleuchinele sunt factori atractanţi pentru *macrofage şi limfocite*, fără specificitate de antigen. Aceste celule infiltrează dermul şi epidermul în 48 de ore. Majoritatea celulelor infiltrate sunt limfocite $TCD_4$, iar circa 99% dintre ele nu au specificitate faţă de antigen. În infiltrat lipsesc PMNN. Mecanismul principal pentru recrutarea celulelor T este activarea independentă de specificitatea antigenică.

Celulele infiltrate – limfocite şi macrofage – secretă factori cu acţiune litică asupra celulelor epidermice.

Compuşii alergici sunt stabili şi pătrund în straturile epidermei, unde se leagă de proteinele membranare ale celulelor din straturile mai profunde. Înainte de legarea cu proteinele, catecolul se oxidează la o quinonă mai reactivă, la care două grupări OH sunt înlocuite cu doi atomi de oxigen. După cuplarea cu proteinele se formează conjugate care activează limfocitele T şi produc o reacţie alergică de tip întârziat.

Contactul iniţial cu compuşii chimici este asociat cu pătrunderea acestora în celulele epiteliale squamoase stratificate ale tegumentului şi legarea de celulele dendritice din epidermă. Alergenul asociat cu moleculele CMH II este expus pe suprafaţa membranei şi prezentat celulelor T.

La contactul secundar cu alergenul, celulele T de memorie recunosc alergenul pe suprafaţa celulelor Langerhans, se activează şi produc limfochine atractante pentru macrofage, celulele Tc şi pentru celulele NK (natural killer). Leucocitele eliberează enzime litice care lizează celulele tisulare ce au legat alergenul, producând o erupţie veziculară.

O chinonă specială – *ubichinona* – forma oxidată a coenzimei Q se găseşte în componenţa catenei respiratorii a celulelor bacteriene aerobe şi a organitelor celulare (mitocondrii şi cloroplaste), având rol în transportul electronilor şi în sinteza ATP. Denumirea de ubichinonă reflectă distribuţia ubicvitară a acestui compus, prezent în toate celulele care fac metabolism aerob. În reacţia de reducere, ubichinona acceptă un proton şi un electron şi devine alcool-ubichinol. Reacţia este esenţială pentru chemiosmoză, unde fluxul de electroni generează o concentraţie mai mare de ioni de $H^+$ (protoni), pe faţa externă a membranei. Când faţa externă a membranei este suficient de încărcată, protonii traversează membrana prin canale speciale pentru a genera molecule de ATP din ADP şi fosfat.

Scanned with OKEN Scanner

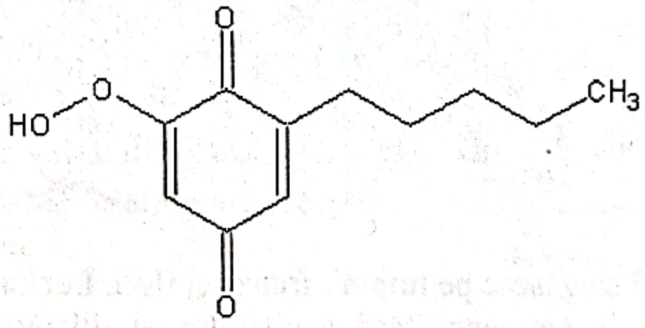
Oţetarul veninos (*Rhus radicans*) este cauza principală a iritaţiilor cutanate în sezoanele de primăvară şi vară, când planta este în creştere. Toate organele plantei, inclusiv polenul, pot cauza iritaţii.

*Coroana cu spini** (*Euphorbia milii*) (fig. 64) este o plantă ornamentală de casă şi de grădină. Sucul tuturor organelor plantei conţine substanţe toxice variate. Contactul tegumentar cu sucul de consistenţa şi culoarea laptelui poate fi iritant.

* Legenda spune că din această plantă, legiunile romane au făcut coroana pe care au pus-o pe capul lui Christos la crucificare. În amintirea legendei, tulpinile lungi ale plantei sunt deliberat orientate să crească cu aspect de coroană.

*Croton* este numele de gen al mai multor specii de arbori tropicali, care au seminţe toxice. Frunzele colorate conţin substanţe cu efecte purgative violente şi proprietăţi *iritante*. Plantele sunt suspectate pentru posibilele efecte cocarcinogene.

*Primula obconica*, o plantă ierboasă ornamentală de casă şi de grădină, produce dermatită la persoanele sensibile după contactul cu alergenul din perii de pe frunze şi tulpini sau din polen. Perii glandulari acumulează alergenul, pe care-l exsudează în picături mici. Substanţa iritantă este *primina*, o quinonă. Concentraţia priminei este maximă în perioada aprilie-august.




Primina

*Reacţia tegumentară iritantă* apare la toţi indivizii umani şi nu necesită starea fiziologică de sensibilizare prealabilă la agentul chimic iritant. Reacţiile iritante nu au substrat imunitar şi se manifestă la toate persoanele, după contactul cu agentul chimic. Substanţele chimice sunt acizi, enzime proteolitice, cristale de oxalat de Ca. În reacţiile nealergice, orice persoană este sensibilă la substanţele din perii glandulari de *Urtica* (histamină, acetilcolină, serotonină).

Genul *Urtica* produce o iritare a tegumentului, dar mai puţin severă decât a oţetarului veninos. Starea de iritare durează câteva minute. Urzicile au peri ascuţiţi, foarte mici, pe tulpini şi pe frunze, cu care injectează iritantul. La *Urtica dioica*, părul înţepător este o celulă alungită, subţire şi ascuţită, denumită *trichom*, care se îngustează spre vârf, dar extremitatea este dilatată, de formă sferică. Baza acestei celule este inclusă într-o formaţiune structurală de celule epidermice, care formează un suport ca un piedestal. Partea mai subţire a trichomului conţine siliciu, iar vârful rotunjit se rupe la cea mai mică atingere, pentru că imediat sub dilatarea terminală, siliciul lipseşte. Astfel se creează un vârf ascuţit, oblic, asemănător unui ac hipodermic. Trichomul canalicular pătrunde în tegument şi injectează amestecul

Scanned with OKEN Scanner

iritant de la bază, format din *histamină, acetilcolină şi 5-hidroxi-triptamină.* Acetilcolina este principalul mediator sinaptic, iar histamina produce modificările vasculare, al căror rezultat este formarea maculelor eritematoase şi edematoase, însoţite de prurit. Urticaria implică dermul superficial.

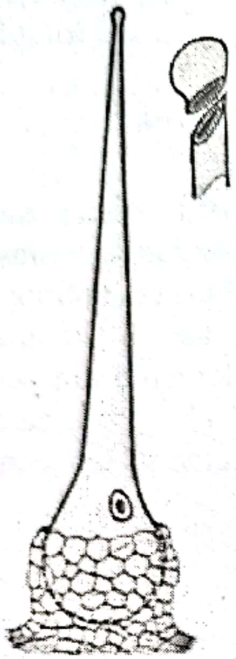



Fig. 63 – Trichomul de *Urtica.*

Fig. 64 – Frunze şi flori de *Euphorbia milii.*

Perii înţepători se găsesc pe tulpini, frunze şi flori. Leziunea cutanată eruptivă este datorată creşterii permeabilităţii capilarelor şi dilatării venulelor. Plasma părăseşte patul vascular şi determină formarea pustulei tegumentare pruriginoase, înconjurată de o zonă de culoare roşie intensă. Lichidul veziculelor eruptive este infiltrat cu limfocite şi PMNN. Reacţia iniţială durează câteva minute, dar contactul repetat intensifică durerea care persistă câteva zile. S-a raportat moartea câinilor de vânătoare, după expunerea masivă la perii urticanţi.

### Substanţe fotosensibilizante

*Fitofotodermatita* semnifică o reacţie fototoxică ce constă în apariţia eritemului tegumentar, cu sau fără erupţie veziculară şi hiperpigmentaţie întârziată. Fototoxicitatea implică o reacţie inflamatorie imediată sau întârziată, cauzată de acţiunea combinată a unui agent fotosensibilizant topic sau ingerat şi radiaţia UV a tegumentului, cu lungime de undă adecvată.

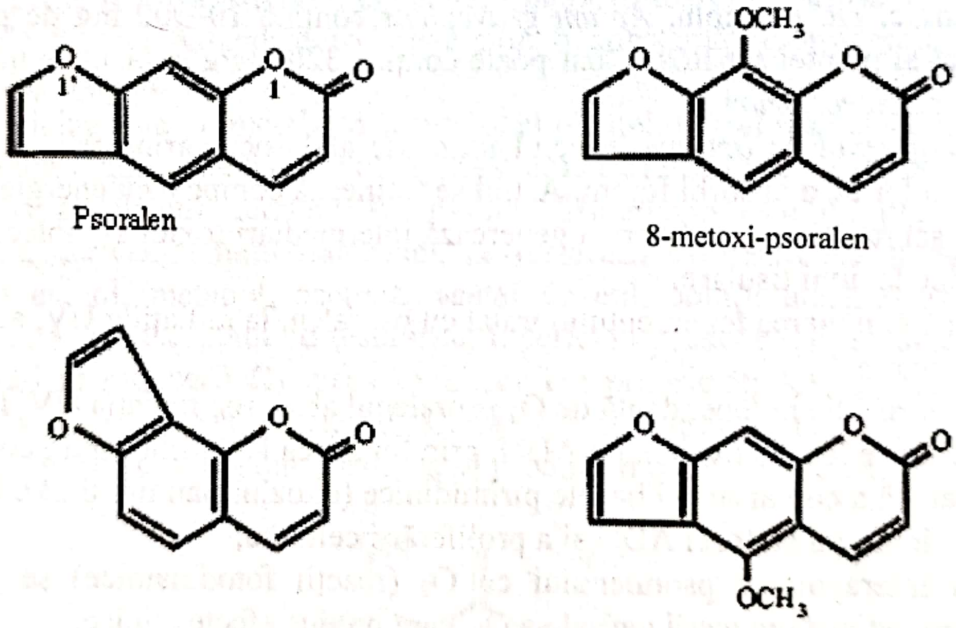
Răspunsul poate să apară la oricare persoană expusă unei cantităţi prag de substanţe chimice fotosensibilizante şi radiaţie UV. Nu este o reacţie cu substrat imunitar şi nu necesită expunerea sensibilizantă anterioară.

Scanned with OKEN Scanner

Efectele sensibilizante au fost produse după contactul cu sucul de *Pastinaca sativa* (familia *Umbeliferae*) şi *Angelica archangelicum*. Reacţia de fotosensibilizare este produsă de furocumarine, urmată de iradierea cu UV cu lungimea de undă de 320–380 nm. Termenul de *fitofotodermatită* subliniază necesitatea acţiunii sinergice a compuşilor chimici ai plantei şi a luminii UV.

Furocumarinele îşi exercită efectul biologic după iradierea cu radiaţii UV cu lungime de undă mare. De exemplu, sucul din frunzele, tulpina sau din rădăcina de *Pastinaca sativa* (păstârnac) şi din ţelină produce dermatita cauzată de *furocumarinele fototoxice*, cu condiţia expunerii simultane la lumină. Efectul fototoxic se datorează interacţiunii fotocatalizate a furocumarinelor (psoralen, ochratoxină A), produse ca rezultat al infecţiei fungice cu *Sclerotinia sclerotiorum*, cu ADN din celulele tegumentare. Umiditatea tegumentului accentuează efectul. Ingestia unei cantităţi mari de rădăcini expune organismul la cantităţi suficiente de *psoralen* pentru a produce efecte fiziologice. Concentraţia toxinelor în ţesuturile plantei este mai mare ca răspuns la infecţiile fungice.

În rădăcina de *Pastinaca sativa* se găsesc 3 furocumarine: psoralen, xantotoxina şi bergapten (fig. 65).




Psoralen — 8-metoxi-psoralen

Angelicina (furocumarina angulara) — 5-metoxipsoralen

Fig. 65 – Structura chimică a *furocumarinei lineare* (psoralen), a *furocumarinei angulare* (angelicina) şi a celor doi psoraleni cu importanţă clinică – *8- metoxipsoralen* (8-MOP = xantotoxina) şi *5 – metoxipsoralen* (5-MOP = bergapten).

5-MOP (bergapten) şi 8-MOP (xantotoxina) sunt cele mai comune furocumarine în ţesuturile plantelor fototoxice. Psoralenul este rareori prezent sau se găseşte în concentraţii mici. Furocumarinele lineare (psoralen) sunt mai fototoxice decât cele angulare. Excepţia este furocumarina angulară din *Heracleum*

(familia *Umbeliferae*). Cele mai severe reacţii fototoxice se produc cu 5-metoxi-psoralen (bergapten) din *Citrus bergamia* (familia *Rutaceae*).

Furocumarinele îşi exercită efectul biologic după iradierea cu UV cu lungime mare de undă. Un exemplu este *dermatita* produsă de ţelina roşie care apare numai la indivizii care manevrează aceste plante, cu expunerea simultană la lumină. Efectul fototoxic se datorează interacţiunii fotocatalizate a furocumarinelor (de exemplu, psoralenul este produs în ţelină ca rezultat al infecţiei fungice cu *Sclerotinia sclerotiorum*), cu ADN celular. Legarea furocumarinelor cu ADN necesită acţiunea luminii UV. Capacitatea furocumarinelor de a forma legături transversale în molecula de ADN prin intercalarea între perechile de baze este importantă pentru activitatea biologică.

Aceşti compuşi sunt *fototoxici, mutagenici* şi *fotocarcinogenici*. Concentraţia cumulată este de 40 ppm. Consumul a 100 g rădăcină de *Pastinaca sativa* expune organismul la 4–5 mg de psoralen, nivel care poate cauza efecte fiziologice: sunt substanţe fotosensibilizante şi foarte mutagene sub acţiunea UV cu lungime mare de undă.

Furocumarinele sunt implicate în reacţiile de apărare naturală a plantei faţă de atacul fungic. De exemplu, *Apium graveolens* conţine 10–100 mg de psoralen/g ţesut uscat al plantei sănătoase, dar poate conţine 320 mg/g la plantele infectate cu *Sclerotinia sclerotiorum*.

*Mecanismul de acţiune*. Efectul fototoxic al furocumarinelor se bazează pe capacitatea lor de a absorbi fotoni. Astfel se formează compuşi cu energie înaltă, cu existenţă scurtă. Energia eliberată generează intermediari toxici ai moleculei de $O_2$ care produc leziuni tisulare.

După expunerea tegumentului tratat cu psoralen, la radiaţiile UV, au loc două reacţii distincte:

- într-o reacţie independentă de $O_2$ psoralenul absoarbe radiaţia UV. Psoralenul excitat se leagă covalent cu ADN, prin formarea legăturilor între componenta furanică a cumarinei şi bazele pirimidinice (citozină sau timidină). Rezultatul este inhibiţia sintezei ADN şi a proliferării celulare;
- prin interacţiunea psoralenului cu $O_2$ (reacţii fotodinamice) se generează intermediarii reducerii parţiale a $O_2$, care produc efecte clinice.

Dacă reacţiile psoralenului independente de $O_2$ produc cele mai mari leziuni celulare, reacţiile dependente de $O_2$ produc manifestări clinice.

Sub acţiunea psoralenului, intermediarii reactivi ai reducerii $O_2$ se formează în nucleul, în membrana şi în citoplasma celulelor epidermice, dermice şi endoteliale. Hiperpigmentaţia indusă de psoralen este rezultatul formării unor fotoproduşi bifuncţionali în ADN al cheratinocitelor şi melanocitelor, al stimulării mitozei cheratinocitelor din stratul bazal şi al melanocitelor. Populaţia de melanocite se dublează sau se triplează în 3–7 zile. Melanocitele se hipertrofiază şi creşte numărul prelungirilor citoplasmatice. Creşte activitatea tirozinazică şi este

Scanned with OKEN Scanner

sintetizată o cantitate mai mare de melanină, care este depozitată în numărul crescut de melanosomi din melanocite, de unde este transferată în stratul malpighian al cheratinocitelor. Pigmentaţia durează luni sau ani.

Reacţiile tegumentare inflamatorii au intensitate maximă la 72 de ore. Sunt dureroase, fără prurit şi apar mai ales în a doua parte a verii, când concentraţia de psoralen este maximă, iar tegumentul este expus direct luminii solare. Reacţia tegumentară este favorizată de umiditate.

Fitofotodermatita nu are substrat imunitar şi poate fi declanşată la orice persoană stimulată cu furocumarină şi raze UV. Leziunea tegumentară este cauzată de plante din mai multe familii, dintre care cele mai importante sunt:

*Umbeliferae (Apiaceae- Ammi majus, Angelica archangelica, Angelica sylvestris, Heracleum lanatum, Pastinaca sativa);*

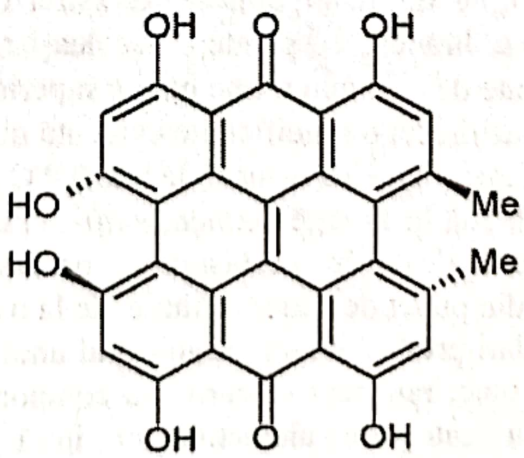
*Leguminosae (Fabaceae- Psoralea corylifolia);*

*Moraceae(Ficus carica);*

*Rutaceae* (*Citrus aurantifolia, Ruta graveolens, Dictamus albus*).

*Hipericina.* Pe frunzele de *Hypericum perforatum* (sunătoare) se găsesc numeroase puncte mici, translucide, care corespund *glandelor* foliare. Conţinutul glandular poate fi sursa iritaţiilor cutanate. Compuşii toxici se găsesc şi în celelalte ţesuturi ale plantei. Glandele foliare conţin o substanţă fluorescentă, roşietică, denumită *hipericină.*

Hipericina este un metabolit secundar al plantei. Iniţial s-a considerat că este chiar principiul antidepresiv, dar ulterior s-a arătat că acest efect este produs de un alt compus al plantei denumit *hiperforină.* Hipericina este un pigment roşu, fluorescent, derivat al naftodiantronei, ce formează săruri cu Na şi cu K. Este solubil în etanol, metanol, acetonă, acetat de etil, soluţii alcaline apoase, dar insolubil în apă. În contact cu ţesuturile, hipericina produce oxigen singlet şi alţi intermediari ai reducerii $O_2$, ceea ce îi conferă proprietăţi fototoxice. Absoarbe lumina UV şi a spectrului vizibil. Compusul chimic este un fotosensibilizant primar, deoarece acţiunea fotodinamică se produce numai în tegument.




Hipericina

Hipericina este o *fototoxină*, adică o toxină care se activează sub acţiunea luminii solare şi produce efectul fotosensibilizant, care se exteriorizează prin dermatită ce constă într-o erupţie cutanată la animalele (bovine, ovine, cabaline, porcine) care se hrănesc cu planta sau la persoanele care utilizează produsele farmaceutice obţinute din această plantă. Reacţia este mai severă după consumul plantei proaspete, dar şi plantele uscate produc fotosensibilizare, chiar dacă 80% din hipericină se pierde. Contactul tegumentar cu planta produce rareori iritaţii.

*Protecţia* faţă de plantele toxice presupune următoarele precauţii:
- evitarea contactului cu plantele necunoscute;
- recunoaşterea plantelor toxice;
- evitarea consumului plantelor necunoscute;
- evitarea utilizării plantelor necunoscute în scopuri farmacologice;
- nu toate organele unei plante comestibile sunt lipsite de riscuri consecutive consumului;
- toxinele nu sunt totdeauna inactivate prin preparare;
- produsele de ardere ale unor plante pot fi foarte toxice.

**Semnificaţia ecologică a toxinelor şi a substanţelor potenţial toxice produse de plante**

Multe plante au elaborat căi subtile de protecţie chimică faţă de ierbivorele consumatoare sau faţă de insectele care se hrănesc cu ţesutul vegetal sau cu sucul din ţesuturi. Unele plante intoxică organismul animal consumator, iar altele produc substanţe complexe care interferă cu ciclul de creştere al consumatorului sau cu capacitatea de a digera ţesuturile ingerate. Unele ierbivore şi insecte au elaborat mecanisme de răspuns la armele chimice ale plantelor.

Studiul interacţiunilor chimice dintre organisme stă la baza unei discipline noi, denumită *ecologie chimică*. Ecologia chimică studiază rolul produselor chimice naturale în relaţiile dintre organisme. O astfel de relaţie este hrănirea. Toate organismele care se hrănesc cu plante au aceleaşi necesităţi nutriţionale de bază, care pot fi satisfăcute de cele mai multe plante superioare. Totuşi, ierbivorele, dar în special insectele manifestă o specificitate evidentă de nutriţie. Care este baza selecţiei sau respingerii unei plante ca resursă de hrană ? O plantă este adecvată sau neadecvată ca sursă de hrană în funcţie de *metaboliţii secundari* pe care-i produce – adică substanţele neimplicate în desfăşurarea proceselor vieţii. Metaboliţii secundari sunt variabili din punct de vedere chimic, de la o specie la alta.

Metaboliţii secundari produşi de un organism al unei specii care influenţează creşterea, starea de sănătate, rata reproducerii sau comportamentul altor specii se numesc *alelochime*. În categoria alelochimelor intră substanţele atractante, repelente, alergene şi toxice.

Scanned with OKEN Scanner

Unele plante produc glicozide cianogene şi le depozitează în frunze. Glicozidele sunt degradate şi eliberează acidul cianhidric. Numai unele plante pot produce atât glicozidele cianogene cât şi enzimele hidrolitice necesare eliberării HCN. Numai plantele care produc ambele seturi de enzime se pot apăra pe calea glicozidelor cianogene.

Capacitatea de a produce HCN liber variază la diferite plante ale genului *Lotus*, în funcţie de condiţiile de mediu. Un procent mare de plante în regiunile mai calde produc atât glicozide cianogene cât şi enzimele necesare eliberării HCN. În zonele cu ierni reci, mult mai puţine plante sunt cianogene. Temperatura scăzută a sezonului rece este ea însăşi un mecanism de control foarte eficient al populaţiilor de plante: nevoia de apărare chimică este mai puţin evidentă. În regiunile calde din jurul mării Mediterane, circa 70–90% dintre plantele de *Trifolium* colectate sunt cianogene, iar în regiunile reci din Rusia, plantele de *Trifolium* sunt acianogene. Capacitatea de a produce cianide libere ar fi mai avantajoasă pentru plantele din regiunile mai calde, unde consumatorii rămân activi tot timpul anului.

Unele alelochime protejează plantele care le produc nu prin intoxicarea sau efectul repelent asupra consumatorului, ci prin interferenţa cu ciclul de creştere şi dezvoltare a acestuia. Multe insecte parcurg cele 3 stadii distincte morfologic, în cursul dezvoltării: larvă, pupă şi adult. Altele nu parcurg stadii morfologic diferite: la ecloziune se aseamănă cu adultul, dar parcurg câteva stadii de năpârlire în timpul cărora cresc la dimensiunile adultului. În dezvoltarea insectelor au rol important două categorii de hormoni: *hormonii juvenili* produşi de larve şi un grup de hormoni denumiţi *ecdisteroizi* (cei mai cunoscuţi fiind ecdizonul şi 20–hidroxiecdizonul), care au rol în iniţierea stadiilor succesive de dezvoltare.

Unele plante, de exemplu feriga comună (*Polypodium vulgare*) produc substanţe asemănătoare structural şi funcţional ecdizonilor – *fitoecdizoni*. Fitoecdizonii pot funcţiona ca agenţi protectori eficienţi, perturbând ciclul de creştere al insectelor care se hrănesc cu plantele producătoare ale acestor compuşi. Concluzia a fost dedusă din observaţia că lăcustele în cursul migraţiei, distrug toată vegetaţia savanei, cu excepţia plantei *Ajuga remora*. Extractele acestei plante au produs modificări majore ale ciclului de dezvoltare în tranziţia de la stadiul de larvă la cel de pupă. *Ajuga remora* produce fitoecdizoni, cu acţiune asemănătoare cu aceea a ecdizonilor insectelor.

Probabil că unele substanţe toxice produse de plante reprezintă bariera chimică de apărare faţă de ierbivore. Ca răspuns, unele ierbivore evită consumul plantelor, iar altele au elaborat mecanisme de detoxificare a compuşilor chimici toxici ai acestora.

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul VI*

# TOXINE PRODUSE DE NEVERTEBRATE

Nevertebratele producătoare de substanţe toxice şi veninuri aparţin celenteratelor, moluştelor şi artropodelor.

*Palitoxina* este o moleculă nepeptidică, un *polieter macrociclic* solubil în apă, cu gr. mol. de circa 3 kDa, agentul intoxicaţiilor produse de crab, scrumbie şi sardine. Are o catenă lungă de atomi de C, cu numeroase grupări funcţionale.

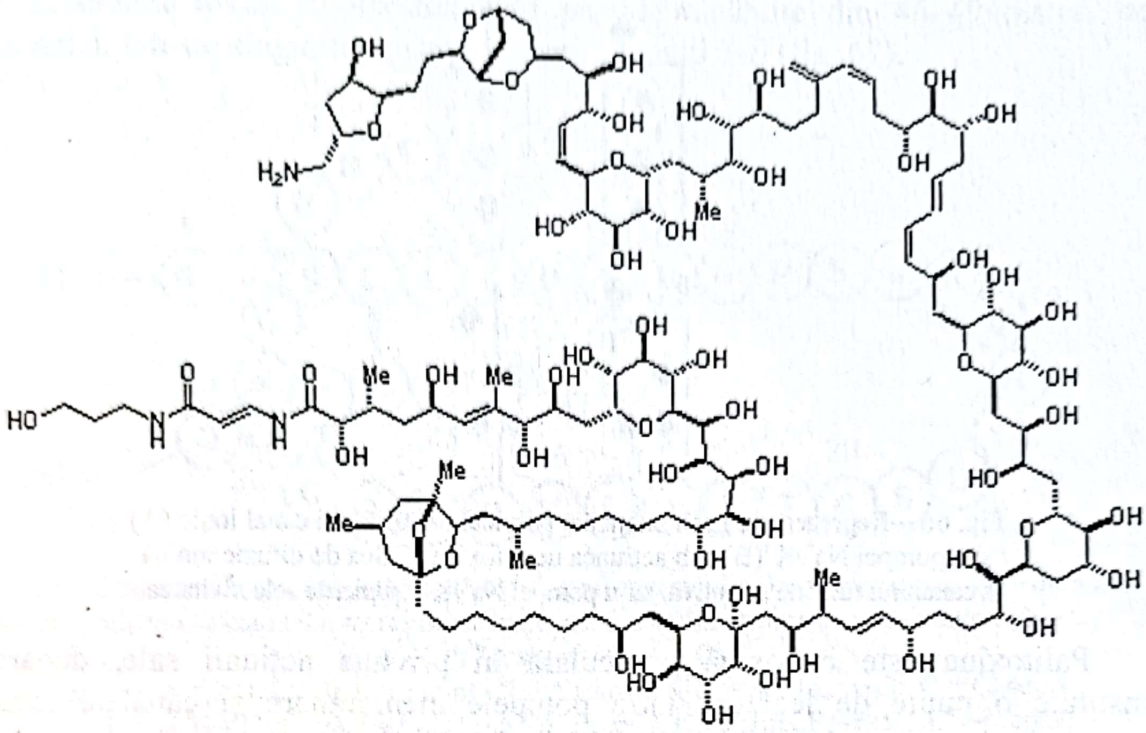
Intoxicaţiile sunt severe, cu o rată înaltă a mortalităţii. Toxina conferă un gust neobişnuit peştelui contaminat.

Palitoxina este produsă de *coralii Palythoa toxica* şi *Palythoa tuberculosa*, răspândiţi în tot sudul Pacificului. Coralii sunt fotosintetizanţi şi supravieţuiesc fără hrană organică, dar hrănirea ocazională cu creveţi este benefică şi creşterea este mai rapidă. Palitoxina s-a identificat ca agent cauzator al intoxicaţiei de tip ciguatera, după consumul crabului, macroulul şi sardinei din Pacific. Se presupune că toxina ar fi sintetizată de un dinoflagelat – *Ostreopis siamensis*, iar coralii concentrează produsul toxic. Extractul brut cu etanol din coralul *Palythoa toxica* are o toxicitate atât de mare, încât DL50 s-a determinat cu dificultate: DL50 este cuprinsă între 50–100 ng/kg corp, după injecţia intraperitoneală la şoarece. O doză de 60 ng/kg produce moartea câinelui în 5 min. Doza toxică mortală pentru om ar fi de 4 μg. Are acţiune vasoconstrictoare intensă. Este cea mai toxică substanţă organică cunoscută, chiar mai toxică decât toxina botulinică.

Palitoxina este o moleculă polieterică macrociclică, cu regiuni *lipofile* şi *hidrofile*. Are cea mai lungă catenă de atomi de C cunoscută, evidenţiată într-un produs natural. În moleculă ($C_{129}$ $H_{223}$ $N_3$ $O_{54}$), 115 atomi de C din cei 129 sunt în catenă continuă. Catena de 115 atomi de C încorporează multe grupe funcţionale: o amină terminală primară, importantă pentru activitatea biologică, o amidă nesaturată etc. Conţine 64 de centri stereogeni, adică palitoxina poate avea 264 stereoizomeri. Legăturile duble pot să prezinte izomerie cis-trans, ceea ce înseamnă că palitoxina poate avea peste $10^{21}$ stereoizomeri.

Palitoxina acţionează la nivelul membranei citoplasmatice şi măreşte permeabilitatea pentru cationi: $Na^+$, $K^+$, $Ca^{2+}$. Multe funcţii celulare depind de controlul transportului acestor ioni în şi din celulă. Perturbarea transportului ionic periclitează viaţa celulei. Cel mai sensibil organ la echilibrul ionic este miocardul. Efectul primar al toxinei este vasoconstricţia în muşchiul cardiac şi în plămâni, iar cel secundar este *hemoliza*. Cumularea acestor efecte întrerupe fluxul sanguin şi efectul este mortal.

Scanned with OKEN Scanner



Structura chimică a palitoxinei

Studiul canalelor ionice membranare a beneficiat de utilizarea toxinelor naturale, cu acțiune specifică asupra canalelor ionice. În era *postgenomică*, toxinele sunt considerate instrumente moleculare esențiale pentru studiul permeabilității membranare. Este greu de identificat o substanță cu acțiune inhibitorie specifică asupra unui *transportor ionic* sau asupra unei *pompe*. Pompa Na/K, cea care menține gradientul normal al $Na^+$ și $K^+$ de o parte și de alta a membranei, este o excepție, deoarece este ținta specifică a două tipuri de toxine naturale: *glicozizii cardiotonici* și *palitoxina*. Glicozidele se leagă de pompa $Na^+/K^+$, când situsurile de legare a $Na^+$ sunt deschise spre latura extracelulară.

Pentru canalele de $Na^+$ și $K^+$, unele medicamente acționează prin prevenirea închiderii canalului sau prin inactivarea lor.

$Na^+$-$K^+$-ATP-aza pompează $Na^+$ și $K^+$ prin membrana celulei, contra gradientului electrochimic, astfel încât 3 ioni de $Na^+$ sunt pompați din celulă și 2 ioni de $K^+$ sunt transportați în interior pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizată. Pompa ionică membranară funcționează prin deschiderea succesivă a situsurilor de legare pentru ioni: un situs se deschide pe fața citoplasmatică, iar celălalt se deschide pe latura extracelulară. Când se deschide situsul citoplasmatic, legarea ionilor de $Na^+$ activează hidroliza ATP și situsul se închide. Ulterior se deschide situsul extracelular, ceea ce permite $Na^+$ să se desprindă de situs, iar ionului de $K^+$ să se lege. Legarea $K^+$ comută pompa la defosforilare și închide situsul extracelular. Se deschide situsul citoplasmatic și ionii de $K^+$ sunt eliberați în celulă.

În prezența palitoxinei, pompa $Na^+$-$K^+$ este convertită într-un *canal deschis* care permite efluxul $K^+$ și influxul cationilor monovalenți: $Na^+$, $NH_4^+$, $Cs^+$, $Li^+$. Palitoxina induce depolarizarea puternică a membranei (fig. 66).

Scanned with OKEN Scanner

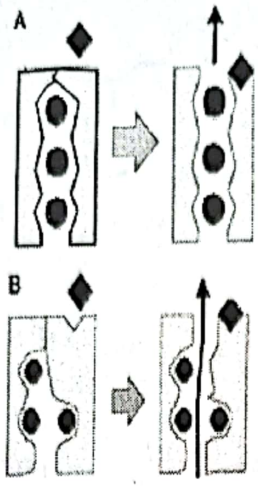



Fig. 66 – Reprezentarea schematică a permeabilizării unui canal ionic (A) şi a pompei $Na^+/K^+$(B) sub acţiunea unei toxine. Calea de difuzie ionică a canalului rămâne selectivă, iar a pompei $Na^+/K^+$ îşi pierde selectivitatea.

Palitoxina este o toxină particulară în privinţa acţiunii sale, deoarece constituie o punte de legătură între pompele membranare şi canalele ionice. Pompele ionice şi canalele se aseamănă prin funcţia şi structura lor. Pompa trebuie să aibă două situsuri de legare a ionilor: unul ce se deschide pe latura citoplasmatică şi altul ce se deschide pe latura extracelulară. O pompă are în permanenţă unul dintre situsuri închis. Canalele sunt proteine membranare care prin *modificări conformaţionale* permit tranzitul selectiv al ionilor de o parte şi de alta a membranei.

Palitoxina induce deschiderea concomitentă a ambelor situsuri ale pompei $Na^+/K^+$, pe care o converteşte într-un *canal ionic nespecific*. Şi alte toxine acţionează prin inhibiţia închiderii canalului sau prin inactivare. De exemplu, sub acţiunea veratridinei din *Veratrum*, canalele de $Na^+$ rămân deschise pentru perioade lungi de timp şi prelungesc potenţialele de acţiune prin încărcarea celulei cu $Na^+$.

Rezultatul dezechilibrului ionic al celulei este contracţia cronică a tuturor grupelor de muşchi. Palitoxina este hemolitică, induce eliberarea histaminei şi inhibă ATP-aza $Na^+$-$K^+$. Intoxicarea cu palitoxina se distinge de ciguatera prin severitate, mortalitatea înaltă şi gustul neobişnuit al peştelui contaminat. Este, de asemenea, un iritant puternic al tegumentului şi un activator tumoral puternic.

Palitoxina a fost preparată sintetic în 1989.

Celenteratele din clasa *Scyphozoa* şi *Hydrozoa* au *nematocişti*, un aparat de inoculare a veninului, format din *cnidoblast*, care se descarcă la contactul cu prada.

*Anemonele de mare* (*Actinaria*) sunt animale solitare marine, carnivore, comune în apropierea ţărmului marin, care trăiesc fixate pe substratul dur (roci, corali etc.). Au tentacule care poartă mii de celule – *cnidoblaste*, fiecare având un organit de înţepare – *nematocist*. Tentaculele înconjură o deschidere bucală centrală, folosită pentru a imobiliza şi transfera hrana (moluşte, crustacee, peşti mici) spre cavitatea bucală. Pe marginile tentaculelor se găsesc celule (cnidoblaste)

Scanned with OKEN Scanner

care eliberează toxinele. Acestea sunt peptide alcătuite din 46–49 resturi de aminoacizi, într-un singur lanţ, stabilizat prin 3 punţi S-S (fig. 67).

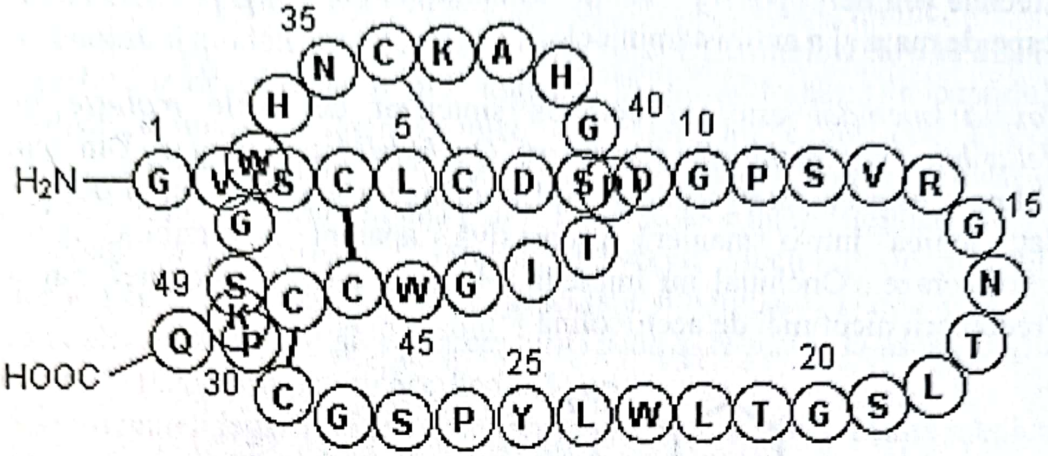



Fig. 67 – Structura chimică a *antopleurinei A*, neurotoxina din *Anthopleura xanthogrammica*. Este un polipeptid alcătuit din 49 resturi de aminoacizi, stabilizat prin 3 punţi S-S între $Cys^4$ - $Cys^{46}$, $Cys^6$- $Cys^{36}$ respectiv $Cys^{29}$ - $Cys^{47}$.
Iniţialele: A = Alanină, R = Arginină, N = Asparagină, D = Acid aspartic, C = Cisteină, G = Glicină, H = Histidină, I = Isoleucină, L = Leucină, K = Lizină, P = Prolină, S = Serină, T = Treonină, W = Triptofan, Y = Tirozină, V = Valină.

Ca mecanism de acţiune, toxinele anemonelor sunt *neurotoxine*, deoarece modifică rata eliberării neurotransmiţătorilor sinaptici. Excitabilitatea celulelor nervoase este controlată de *canalele ionice*, care funcţionează ca *receptori* pentru mediatorii sinaptici *excitatori* (acetilcolina, serotonina, glutamatul) şi *inhibitori* (GABA, glicina). Ţintele principale ale neurotoxinelor sunt canalele de $Na^+$ şi de $K^+$. Blocarea canalelor ionice sub acţiunea toxinei de anemonă duce la paralizia transmiterii neuronale în muşchii scheletici. Simptomele clinice: aritmia cardiacă, insuficienţa respiratorie, consecinţa acesteia fiind insuficienţa cardiacă.

Toxicitatea anemonei de mare este înaltă, nu numai pentru pradă, ci şi pentru alte organisme acvatice (peşti mici). Doza letală pentru şoarece este cuprinsă între 1 şi 100 µg/kg, comparabilă cu cei mai toxici compuşi organofosforici.

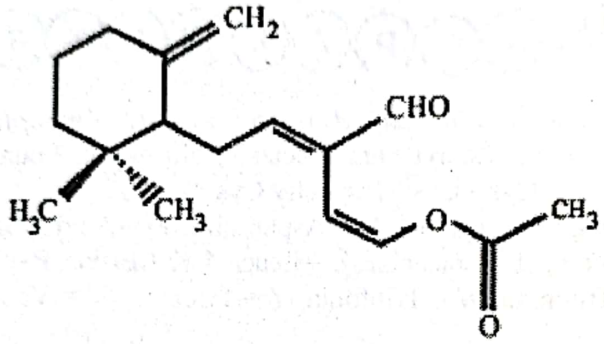
Severitatea toxicităţii este variabilă: medie de cele mai multe ori sau severă produsă de *Chiromex fleckeri* (viespea de mare). Veninul este un amestec complex şi cuprinde proteine, enzime, polipeptide, 5-hidroxitriptamină, tetramină. Veninul nematocişţilor produce în primul rând o traumă mecanică a tegumentului, cu leziuni inflamatorii însoţite de durere, senzaţia de arsură şi prurit, eritem, edem, creşterea temperaturii locale. Contactul secundar după câteva săptămâni produce *dermatită*. Durerea şi eliberarea locală a histaminei sunt atribuite 5-hidroxi-triptaminei. Efectele asupra conducerii nervoase (asemănătoare curarei) se datorează *tetraminei*. Durerea se instalează rapid, cu intensitate varibilă, de la medie la severă cu eritem şi edem. Mecanismul prin care viespea de mare produce insuficienţa cardiacă şi respiratorie s-ar putea datora blocării impulsurilor nervoase la joncţiunile sinaptice, asemănător acţiunii curarei.

Scanned with OKEN Scanner

Anafilaxia (colapsul circulator) este posibil la indivizii sensibilizaţi. Veninul de *Chiromex* poate produce moartea indivizilor umani în mai puţin de 15 minute.

Efectele veninului pot fi prevenite prin administrarea rapidă a serului specific anti-viespe de mare şi a antihistaminicelor.

*Toxina onchidal* este un compus sintetizat de unele *moluşte* marine: *Onchidella binneyi, Onchidella nigricans, Onchidella patelloides*. Din punct de vedere chimic este un *ester-acetat* lipofil asemănător acetilcolinei şi deşi nu este fosforilat, inhibă într-o manieră progresivă, aparent ireversibilă, activitatea acetilcolinesterazei. Onchidal nu împiedică legarea α-bungarotoxinei marcată cu $I^{125}$, de receptorii nicotinici de acetilcolină.




Structura chimică a toxinei onchidal

Toxina pare să aibă rolul de protecţie chimică a organismelor producătoare.

*Tetramina* (tetrametil-amoniu) se găseşte în glandele salivare de *Neptunia decemcostata* (un gasteropod marin). Spre deosebire de alte biotoxine, tetramina este produsă chiar de melc şi nu este dobândită prin consumul fitoplanctonului toxic. Intoxicaţia cu tetramină produce vedere confuză, pierderea lucidităţii mentale, nesiguranţă motorie. Toxina este concentrată în glandele salivare şi mai puţin în alte organe. Fierberea melcilor timp de o oră nu inactivează toxina, dar după scoaterea glandelor salivare, melcii devin comestibili.

*Conotoxina.* Melcii din genul *Conus* (*Conus geographus*) produc un venin care conţine peptide scurte denumite *conotoxine*. Veninul fiecărei specii este un amestec de *peptide toxice*, împreună cu alte molecule. În forma activă, aceste peptide constau din 15–40 aminoacizi cu un schelet foarte bine conservat de cisteină care formează punţi multiple S-S, prin plierea peptidului.

Toate cele circa 500 specii ale familiei *Conidae* sunt prădători ai peştilor mici, moluştelor şi viermilor marini. Fiecare specie are un repertoriu de 50–200 fragmente peptidice scurte, diferite, pe care le folosesc ca venin.

Mai multe specii de animale sintetizează peptide toxice stabilizate prin astfel de legături S-S, dar nici una nu este aşa de scurtă cum sunt conotoxinele. Conotoxinele sunt sintetizate sub forma unor *propeptide* de lungime intermediară. Resturile de cisteină sunt concentrate în vecinătatea capătului –COOH. După ce proteina s-a pliat,

Scanned with OKEN Scanner

capătul N-terminal este clivat şi rămâne numai capătul scurt bogat în cisteină. Capătul N-terminal clivat al propeptidului pare a fi implicat în asistarea plierii peptidului. Peste 75 peptide din veninuri au fost caracterizate biochimic.

Se cunosc 6 modele structurale de bază ale conotoxinelor, care se disting prin poziţia resturilor de cisteină şi prin numărul de bucle formate în peptidul pliat. Resturile de aminoacizi intercisteinice ale diferitelor conotoxine din aceiaşi categorie sunt hipervariabile, ceea ce sugerează existenţa unui mecanism genetic special care generează variabilitatea înaltă a secvenţelor intercisteinice.

*Mecanismul de acţiune*. Toxinele îşi produc efectul toxic prin blocarea canalelor ionice specifice ale celulelor musculare şi nervoase. Ţintele conotoxinelor sunt canalele de Na, Ca şi K, receptorii pentru N-metil D-aspartic-glutamat, vasopresină şi receptorii pentru acetilcolină.

Specificitatea legării de canalele ionice este remarcabilă. Multe medicamente se leagă de ţinta specifică, dar se leagă şi de ţinte înrudite şi produc efecte secundare nedorite, dar conotoxinele, spre deosebire de cele mai multe medicamente, pot să distingă între tipurile de receptori înrudiţi. De exemplu, medicamentul dihidropiridina folosit pentru blocarea canalelor de $Ca^{2+}$ se leagă de canalele specifice din muşchiul striat, neted şi cardiac şi din celula neuronală.

Specificitatea de legare a conotoxinelor este neegalată. Legarea strictă de receptor a conotoxinei creează un avantaj net al melcului. Toxina sa produce paralizia prăzii şi pentru ca efectul să fie maxim, întreaga cantitate trebuie să-şi atingă ţinta. Conotoxina α blochează receptorul numai la joncţiunea neuromusculară şi nu la cea interaxonală. Conotoxinele Mu disting între canalele de Na musculare şi neuronale.

Conotoxina α inhibă acţiunea acetilcolinei la nivelul *receptorilor nicotinici*, care sunt *canale de Na* ale celulei musculare striate. Blocarea propagării impulsului nervos se face postsinaptic la nivelul joncţiunii neuromusculare şi este urmată de paralizie şi moarte.

Receptorul nicotinic de acetilcolină este un canal ionic dependent de ligand. Canalul ionic este format prin asamblarea unui pentamer proteic membranar, care leagă mediatorul acetilcolina. Receptorul leagă de asemenea *agonişti* (substanţe cu efect asemănător) ca nicotina şi *antagonişti* (substanţe cu efect opus).

Legarea acetilcolinei sau a nicotinei de subunitatea α a receptorului nicotinic induce o schimbare conformaţională, care permite influxul Na şi Ca în celulă. Influxul poduce depolarizarea membranei şi activarea canalelor ionice pentru Na şi Ca, dependente de voltaj. Mediatorul este eliberat din veziculele membranei presinaptice.

Receptorii nicotinici de acetilcolină sunt de tip *muscular* şi *neuronal*. Receptorul nicotinic de tip *muscular* este alcătuit din 5 subunităţi: 2α, β, γ, δ, fiecare cu gr. mol. de 40–60 kDa. Glicozilat, în stare nativă, pentamerul are gr. mol. de 290 kDa. În alcătuirea unui receptor se găsesc doi pentameri, asociaţi prin legături S-S.

Mecanismul prin care se produce paralizia implică legarea α-conotoxinei de una din subunităţile α ale canalului ionic de care se leagă nicotina. Astfel este blocată legarea acetilcolinei şi agoniştilor (nicotina) (fig. 68).

Scanned with OKEN Scanner

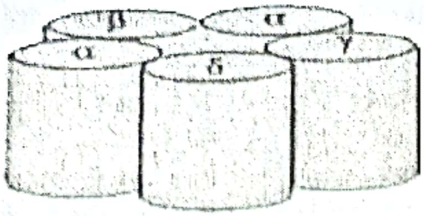



Fig. 68 – Reprezentarea schematică a receptorului nicotinic postsinaptic.

Receptorul nicotinic de tip *neuronal* este de asemenea un pentamer, alcătuit din subunităţi α sau β, dar nu are subunităţi γ sau δ.

Conotoxinele α inhibă complexul cu rol de receptor de acetilcolină şi de canal de Na. Au fost primele toxine izolate din melcii genului *Conus* şi s-au desemnat ca « α » pentru că au acelaşi mecanism de acţiune ca şi neurotoxinele α de şarpe (de exemplu, α bungarotoxina).

Sunt peste 2000 de variante biochimice de conotoxine în cele 6 clase structurale identificate:

- *alfa-conotoxinele* se leagă de receptorul nicotinic de acetilcolină. Produc paralizia ca şi curara;
- *Mu-conotoxinele* se leagă de canalele de Na, care sunt ţinta saxitoxinei şi tetrodotoxinei. Efectele sunt comune;
- *omega-conotoxinele* se leagă de canalele de Ca, cu rol în transmiterea impulsului nervos la joncţiunea neuromusculară. Toxina inhibă trecerea ionilor de Ca în celulele muşchiului cardiac şi în celulele muşchilor netezi. Pentru contracţia muşchiului cardiac este necesar influxul unei cantităţi suficiente de ioni de Ca. Contracţia se realizează prin interacţiunea microfilamentelor de actină cu cele de miozină, care alunecă unele pe altele. $Ca^{2+}$ este esenţial pentru fosforilarea miozinei. Insuficienţa $Ca^{2+}$ poate opri activitatea inimii. În clinică, blocanţii canalelor de $Ca^{2+}$ se folosesc pentru scăderea presiunii sanguine, ameliorarea anginei dureroase şi pentru stabilizarea ritmului cardiac;
- *delta-conotoxinele* acţionează asupra canalelor de Na;
- *kappa-conotoxinele* acţionează asupra canalelor de K. Rezultatul este apariţia tremurului;
- *conantonkinele* sunt active asupra receptorului N-metil D-aspartic (NMDA) - glutamat. Blochează impulsurile nervoase care au ca mediator acidul glutamic.

Conotoxinele se obţin din sacii toxici ai melcilor prădători ai genului *Conus*, care trăiesc în apele calde ale Pacificului, din jurul Australiei. Melcii folosesc veninul pentru a imobiliza şi omorî prada: peşti, moluşte, viermi marini.

Fiind peptide mici, foarte stabile, conotoxinele pot fi dispersate ca aerosoli pentru a fi folosite ca arme biologice. Nu se cunoaşte fenomenul toxicităţii prin inhalare. Sunt toxice prin injectare, situaţie echivalentă cu inocularea veninului de către melc.

Toxicitatea veninului este considerabilă, datorită efectelor sinergice sau aditive ale celor câtorva toxine care acţionează la situsuri diferite.

Scanned with OKEN Scanner

Unele midii (*Mytilus*) sunt toxice, dar chiar unele midii comestibile pot deveni toxice, dacă sunt menținute în ape cu conținut crescut de materie organică, în care se dezvoltă populații dense de bacterii și amoebe. Una dintre substanțele toxice este un *alcaloid* cu acțiune asemănătoare curarei – *mitilotoxina*. Toxicitatea se pierde prin fierbere în soluții ușor alcaline.

Artropodele care produc substanțe toxice sunt ***păianjenii, himenopterele*** și ***scorpionii***. Înțepătura albinei și viespei produce mai multe victime decât șerpii, în primul rând datorită manifestărilor anafilactice*, o stare patofiziologică (de sensibilizare) care se instalează consecutiv înțepăturilor multiple.

* *Reacțiile de anafilaxie* (anafilaxia generalizată, reacțiile de anafilaxie locală, denumite și stări atopice sau neobișnuite) includ manifestările patologice care se declanșează consecutiv expunerii secundare la un alergen. Termenul de anafilaxie semnifică o stare opusă celei de protecție.

***Veninul de albine*** este un lichid limpede, galben deschis, cu miros aromat de banane coapte, în conținutul căruia 30–50% este substanța uscată. Reacția ușor acidă (pH = 5,5) este conferită de compușii volatili, pentru că soluția apoasă a veninului uscat în prealabil, nu produce reacția. Picătura depusă pe lamă se usucă în 10–15 minute și pierde substanțele aromatice volatile și circa 25% din acizii grași. În venin se găsesc 18 din cei cei 20 de aminoacizi obligatorii ai proteinelor (metionină, histidină etc.). Componentele veninului aparțin următoarelor categorii:

| | |
|---|---|
| Peptide | Melitina F<br>Apimina<br>Peptidul care produce degranularea mastocitelor (MCD)<br>Secarpina<br>Tertiapina<br>Adolapina<br>Inhibitorul proteazei<br>Procamina A,B<br>minimina<br>cardiopep |
| Enzime | Fosfolipaza $A_2$<br>Hialuronidaza<br>Fosfomonoesteraza acidă<br>Glucozidaza<br>Lizofosfolipaza |
| Amine bioactive | Histamina<br>Dopamina<br>Norepinefrina<br>Leucotriene |
| Componente nepeptidice | *Glucide*<br>Glucoza<br>Fructoza |
| Lipide | 6-fosfolipide |
| Acizi grași aminați | Acid r-aminobutiric<br>Acid β-aminoizobutiric |

Scanned with OKEN Scanner

După înţepătura albinei, local se produce o reacţie inflamatorie. Zona devine eritematoasă cu edem. Semnele dispar în 2 ore, sau persistă la hipersensibili 2–3 zile. Componentele veninului influenţează activitatea SNC, a sistemului vascular şi stimulează răspunsul imun, ceea ce explică valoarea sa terapeutică. Are efect anesteziant de circa 15 ori mai puternic decât medicamentele. Activează circulaţia coronară a sângelui, dilată vasele sanguine din creier, diminuă tensiunea arterială.

*Fosfolipaza A* are acţiune radioprotectoare, este mastocitolitică, eliberează histamina, scade presiunea sanguină, este antigenică şi alergenică, are efect antagonist faţă de toxina α de *Staphylococcus* şi faţă de toxina tetanică, are efect antitumoral şi este activă asupra membranelor biologice.

*Hialuronidaza* hidrolizează selectiv polimerii cu acid hialuronic, măreşte permeabilitatea capilară, este antigenică şi anafilactogenică.

*Apimina*, un polipeptid de 18 aminoacizi, este antigenică şi are proprietăţi antiinflamatoare.

*Melitina*, un polipeptid de 26 aminoacizi, reprezintă 40–60% din substanţa uscată a veninului şi are următoarele activităţi biologice: este antibacteriană, antifungică, antitumorală, inhibă activitatea SNC, blochează sinapsele neuromusculare şi ganglionare, produce contracţia muşchilor striaţi şi netezi, eliberează histamina, are efect protector faţă de radiaţiile x, măreşte permeabilitatea vasculară, este hemolitică, scade presiunea sanguină, este antiinflamatorie, neantigenică, stimulează axa hipofizo-suprarenală cu eliberarea catecolaminelor şi cortizolului, măreşte nivelul cortizolului plasmatic, este activă asupra membranelor biologice. Este unul dintre cei mai puternici agenţi antiinflamatori cunoscuţi şi poate fi folosită în tratarea artritei şi reumatismului. Hipocrat (460–377 î.C.) a folosit veninul de albine în tratamentul artritei.

În punga cu venin, melitina adoptă o conformaţie tetramerică, iar cea monomerică pare a fi adoptată când melitina este injectată prin înţepătură şi vine în contact cu membrana celulară. Este un agent litic puternic: se leagă rapid de eritrocite şi le lizează.

*Peptidul care degranulează mastocitele* are efect antiinflamator şi inhibă dezvoltarea artritei indusă de adjuvant.

*Cardiopep* stimulează forţa de contracţie (efect β-adrenergic) şi ritmul cardiac, fără efect asupra circulaţiei coronariene, este reglator al activităţii cardiace (are proprietăţi anti-aritmice), stimulează axa hipofizo-corticosuprarenaliană, cu eliberarea catecolaminelor şi cortizolului.

*Adolapina* inhibă ciclooxigenaza şi astfel are efect analgezic şi antiinflamator.

Terapia cu venin de albine ilustrează *principiul clasic al homeopatiei, care stabileşte că o substanţă ce produce simptomele unei maladii, în doze mici este medicament pentru maladia respectivă.* Maladia reumatică produce edem, durere, inflamaţie. Înţepătura de albină cauzează aceleaşi simptome. Stimulează sistemul imunitar pe calea axei hipotalamo-hipofizo-suprarenaliană. Apicultura este una dintre profesiile cele mai lipsite de riscuri.

Scanned with OKEN Scanner

Albina înţeapă o singură dată, deoarece se eviscerează în încercarea de a-şi retrage acul.

***Veninul de viespe*** are o compoziţie mai complexă: feromoni (compuşi volatili), histamină, serotonină, acetilcolină, catecolamine, glucide, aminoacizi, poliamine, peptide, enzime (fosfolipazele $A_1$ şi B, hialuronidaza, fosfataza acidă, proteaze, DN-aza, colinesteraza, histidin-decarboxilaza, zaharidaza).

Viespea poate înţepa de mai multe ori.

Simptomele constau în urticarie, prurit, angioedem, bronhoconstricţie, edem laringian, hipotensiune şi colaps vascular. Înţepăturile de albine şi viespe fac 50–100 de victime/an/glob, marea majoritate din cauza obstrucţiei căilor respiratorii

Remediul constă în utilizarea analgezicelor locale şi steroizilor, antihistaminicelor.

Muşcătura păianjenului *Lactrodectus* se aseamănă cu înţepătura himenopterelor şi este asociată cu durere locală, senzaţia de arsură, prurit, eritem cu paloare centrală, ce progresează la nuanţa de vânăt în 1–8 ore. Zona devine hemoragică, cu necroză centrală. În cazurile grave, efectele distructive se pot extinde în masa musculară. Se instalează starea febrilă, tulburările digestive, splenomegalie, icter, hemoliză, hematurie, trombocitopenie, insuficienţă renală.

Muşcătura de tarantula provoacă durere şi contracţie musculară. Perii abdominali urticarianţi produc dermatită. Perii pot fi eliberaţi prin mişcarea picioarelor în contact cu abdomenul.

***Veninul de scorpion***. Dintre cele circa 1000 de specii de scorpioni, o zecime sunt veninoşi. Cele mai multe înţepături de *scorpioni* nu produc un disconfort mai mare decât înţepătura unei albine. Toate speciile de scorpioni îşi omoară prada prin efecte toxice, dar numai circa 20 de specii de scorpioni din întreaga lume produc venin suficient de puternic pentru a avea acţiune letală asupra organismului uman.

Acul este localizat la sfârşitul postabdomenului. Baza acului, sau vezicula, are formă globulară şi se termină posterior cu un spin foarte îngust, curbat, denumit *aculeus*. Vezicula conţine o pereche de saci glandulari care produc şi depozitează componentele veninului. Aculeus funcţionează ca un ac hipodermic: este canalicular şi foarte ascuţit. La vârful acului se găseşte o pereche de deschideri, prin care veninul este eliberat. Fiecare sac cu venin este conectat la una dintre deschideri printr-un duct. Sacii cu venin sunt controlaţi voluntar prin contracţia unor muşchi striaţi, astfel încât scorpionul poate regla cantitatea de venin injectată la o înţepătură. Unii scorpioni nu injectează venin când înţeapă.

Scorpionii folosesc înţepătura pentru capturarea prăzii, în apărare şi în timpul împerecherii. Prada este mai întâi strânsă cu cleştele. Cea care nu poate fi omorâtă prin zdrobire cu cleştele, este înţepată o dată sau de mai multe ori. În timpul împerecherii, masculul înţeapă femela, iar feromonii din conţinutul veninului măresc receptivitatea partenerei.

Scanned with OKEN Scanner

Înţepătura celor mai multe specii produce o reacţie asemănătoare înţepăturii de viespe, foarte dureroasă, dar nu periclitează viaţa.

Veninul de scorpion conţine o varietate de compuşi, majoritatea necunoscuţi. Veninul unui singur scorpion conţine câteva *neurotoxine, histamină, serotonină, enzime, inhibitori enzimatici, diferite săruri, peptide, aminoacizi* şi alţi compuşi neidentificaţi. Datorită importanţei medicale, neurotoxinele au fost cele mai studiate. Numeroase neurotoxine sunt considerate ca având specificitate de ţintă, adică fiecare produce efecte asupra neuronilor unui anumit tip de organism. Unele neurotoxine au cea mai puternică acţiune faţă de insecte, altele pot fi letale pentru moluşte, iar altele acţionează asupra neuronilor mamiferelor. Diferitele toxine pot avea situsuri distincte de acţiune asupra celulei nervoase.

Ţinta specifică a acţiunii neurotoxinelor este reprezentată de canalele de Na şi K, dependente de potenţialul electric, din membrana neuronului. Neurotoxinele modifică potenţialul de acţiune, rezultatul fiind acumularea ionilor de Na sau Ca în celulă şi eliberarea masivă a mediatorilor.

La vertebrate, efectele sistemice consecutive înţepăturii scorpionilor se datorează eliberării unor cantităţi masive de catecolamine din suprarenale.

Fosfolipaza A şi histamina au efect vasodilatator. Serotonina din veninul unor scorpioni are efect vasoconstrictor la mamifere şi probabil determină senzaţia de durere. Serotonina induce contracţii uterine şi cauzează avortul spontan după înţepătura în primul semestru de sarcină.

Simptomele înţepăturii scorpionului veninos au trei niveluri de severitate:

– unele produc numai efecte locale;
– altele produc efecte locale şi sistemice;
– cele mai puternice toxine produc efecte sistemice cu implicarea SNC.

Efectele *localizate*, comune pentru marea majoritate a înţepăturilor produse de scorpioni, indiferent de conţinutul toxic sunt limitate la locul înţepăturii şi includ: durere intensă, edem minor, eritem, prurit, pierderea sensibilităţii.

Implicarea *sistemică* produce simptome foarte diferite: durerea intensă radiază în organism şi este acută în ariile inghinale, agitaţie şi anxietate, creşterea temperaturii corpului, transpiraţie, frisoane, pierderea sensibilităţii feţei, limbii şi gâtului, creşterea uşoară a ritmului cardiac şi a presiunii sanguine. Efectele sistemice pot să apară foarte rapid sau se manifestă la câteva ore după înţepătură.

Efectele *sistemice cu implicarea SNC* sunt semnele unei intoxicări severe şi se datorează eliberării masive a catecolaminelor din medulosuprarenalele victimei şi se manifestă prin febră, salivaţie excesivă, starea de rău general, vomă, stare de confuzie, comă, convulsii, creşterea sau scăderea ritmului cardiac şi a presiunii sanguine, pierderea reflexelor de urinare şi micţiune, creşterea excreţiei de fluid în bronhiole. Moartea survine prin insuficienţă cardiacă şi respiratorie.

Pentru tratamentul cazurilor rare de înţepături ale scorpionilor veninoşi se foloseşte serul imun antivenin.

*Aplicaţii* ale veninului de scorpion. Peptidul *chlorotoxina* din veninul scorpionului gigant din Israel (*Leiurus quinquestriatus*) pare să aibă efecte

Scanned with OKEN Scanner

distructive numai faţă de celulele tumorale din creier, spre deosebire de agenţii chimioterapeutici care acţionează atât asupra celulelor tumorale cât şi asupra celor normale.

*Echinodermele* includ aricii de mare, stelele de mare şi castraveţii de mare. Cele mai multe stele de mare nu produc substanţe toxice. Excepţia este *Acanthaster planei (coroana cu spini),* singura *stea de mare* veninoasă. Braţele ei au spini mari cu un înveliş producător de venin, a cărui compoziţie nu este cunoscută. Nu atacă, dar contactul tegumentar produce edem rapid, eritem şi senzaţia de durere.

Unii *arici de mare* au spini numeroşi, subţiri, fragili şi lungi, iar la capătul lor se găsesc glande cu venin care la contact, pătrund profund în tegument, în ţesutul muscular şi în articulaţii, se rup şi eliberează o toxină care produce senzaţia dureroasă imediată, edem, dureri articulare. Ariciul de mare poate fi toxic prin ingestie, deşi este considerat o delicatesă culinară în Orient şi în zona Caraibelor. Partea toxică o reprezintă gonadele. Intoxicaţia produce salivaţie în exces, durere abdominală, vomă, diaree.

Unele *holoturide* (castraveţi de mare) au organe speciale (organe Cuvier) atât de toxice, încât micile cantităţi de toxine pot omorî aproape toate animalele, de la cele unicelulare până la vertebrate şi chiar plantele. Alţii elimină un mucus otrăvitor prin extruzia şi eversarea faringelui, care poate să orbească prădătorii, inclusiv omul. Mulţi castraveţi de mare toxici au culori vii de avertizare.

Toxina, denumită *holoturină*, este o saponină foarte toxică, un surfactant anionic cu acţiune hemolitică şi neurotoxică. Acţionează ireversibil şi blochează excitabilitatea joncţiunilor colinergice neuromusculare. Holoturina este un *oligoglicozid* triterpenoidic sulfatat. Efectele holoturinei s-au studiat pe muşchiul izolat şi pe preparatele de nerv. Activitatea biologică este asemănătoare cu aceea a colinesterazei. Holoturina este studiată pentru posibile aplicaţii medicale. Studiile preliminare arată că inhibă creşterea tumorilor la şoarece.

*Cucumaria echinata* (castravete de mare) produce o *lectină* hemolitică şi citotoxică pentru unele linii celulare *in vitro*. Sensibilitatea celulelor la toxicitatea lectinei variază, unele având o rezistenţă deosebită. Lectina se leagă de glucidele glicoproteinelor membranare, formează oligomeri şi se inseră în structura membranei citoplasmatice. Capătul N-terminal al lectinei are secvenţă omologă cu catena B a ricinei şi abrinei, lectine vegetale cu toxicitate înaltă, iar regiunea C-terminală este relativ hidrofobă şi probabil formează domenii care iniţiază oligomerizarea. Domeniul N-terminal are 6 repetiţii de 40–50 aminoacizi şi probabil formează două situsuri de legare la glucide, ca şi lanţul B al ricinei şi abrinei.

Holoturidele au importanţă practică, deoarece unele specii produc toxine de interes farmacologic: unii compuşi au activitate antimicrobiană (inhibă creşterea microorganismelor patogene *Trichophyton, Candida, Trichomonas, Aspergillus*) ori acţionează ca medicamente antiinflamatorii şi anticoagulante; alte specii sunt comestibile.

Scanned with OKEN Scanner

*Capitolul VII*

# TOXINE PRODUSE DE VERTEBRATE

Peştii *Lepidocybium flavobrunneum* şi *Ruvettus pretiosus* conţin un ulei cu efect puternic purgativ, denumit *gempilotoxină*. Consumul uleiului conţinut în oase şi în muşchi produce o diaree rapidă şi pronunţată, dar fără dureri şi fără efecte colaterale.

***Tetrodotoxina***. Tetrodotoxina (TTX) este o neurotoxină puternică, cu acţiune rapidă şi letală, denumită astfel după ordinul de peşti care o produce – *Tetraodontiformes* (*tetras*-patru şi *odontos*-dinte). Alte organisme marine şi unele animale terestre otrăvitoare depozitează această toxină. În Japonia, peştele *Fugu rubripes* este o delicatesă datorită gustului incomparabil şi câteva zeci de oameni mor anual intoxicaţi după consumul acestui peşte.

*Mecanismul de acţiune*. În repaus, faţa externă a membranei are sarcina netă pozitivă, datorită excesului ionilor de Na, iar faţa internă este încărcată negativ. În acest stadiu, canalele de Na şi K din membrana axonală sunt închise. Pe un osciloscop, *potenţialul de repaus* se înregistrează ca o linie orizontală (fig. 69).

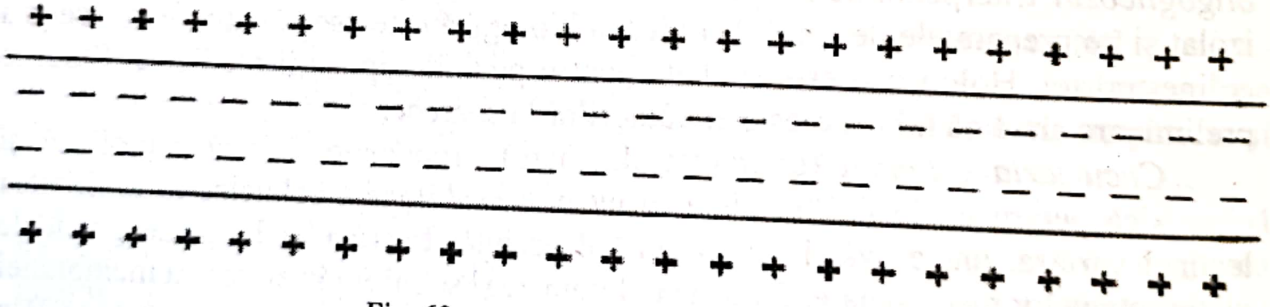


Fig. 69 – Repartizarea sarcinilor electrice în membrana axonală generatoare ale potenţialului de repaus.

Distribuţia ionilor de o parte şi de alta a membranei citoplasmatice, împotriva gradientului de concentraţie este rezultatul mecanismelor de transport activ. Transportul ionilor implică proteinele de transport care au rolul canalelor şi consumul de energie sub forma ATP.

Transportul activ rapid are loc în timpul *depolarizării*, când membrana celulei devine brusc permeabilă pentru Na. Canalele de Na din membrană se deschid şi membrana se permeabilizează pentru Na. Pe toată lungimea axonului se produce influxul rapid al Na. Osciloscopul înregistrează potenţialul de acţiune ca o denivelare caracteristică pozitivă. Pe măsură ce ionii de Na pătrund în axoplasmă,

Scanned with OKEN Scanner

polaritatea se schimbă. O dată cu inversarea polarității, canalele de Na se închid, iar cele de K se deschid. Ionii de K se deplasează de la interior spre exteriorul axonului, într-o undă de repolarizare. Pe un osciloscop, repolarizarea este înregistrată prin denivelarea inferioară (fig. 70).

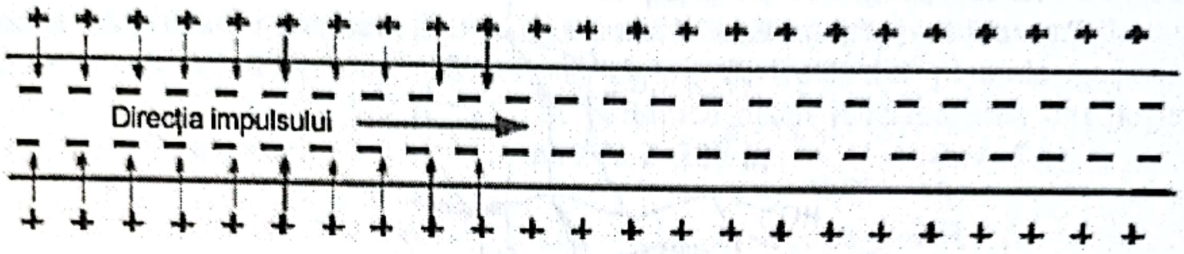



Fig. 70 – Săgețile verticale indică transferul sarcinilor electrice prin membrana axonală și formarea potențialului de acțiune.

O injecție letală de KCl produce un influx major de K în celulă, perturbând raportul ionilor de K și Na, precum și polaritatea membranei neuronale.

Unele neurotoxine blochează canalele de Na și de K și interferă cu polaritatea membranei celulei nervoase în repaus sau cu propagarea undei de depolarizare. Alte neurotoxine nedepolarizante interferă cu acetilcolina sau cu acetilcolinesteraza la joncțiunea neuromusculară.

TTX este o neurotoxină deosebit de puternică și acționează specific prin blocarea *canalelor de Na* dependente de voltaj pe suprafața celulelor nervoase. Molecula are o structură triciclică și constă dintr-un grup guanidinic încărcat pozitiv, care dă numele acestei clase, de *toxine guanidinice*.

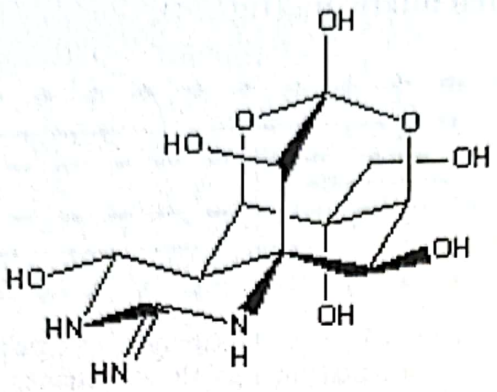
Tetrodotoxina se leagă foarte strâns de canalul de Na, de glutamatul peptidului, deoarece mimează cationul de Na hidratat. Legarea se consolidează prin schimbarea conformației peptidului.

TTX este extrem de toxică. DL50 pentru șobolan este de 8 µg/kg prin injecție sau 30 µg/kg după ingestie. Toxicitatea pentru om este foarte mare dacă este inhalată (150 µg, adică 2 µg/kg). Toxina ingerată necesită doze mai mari deoarece molecula este sensibilă la aciditatea gastrică. Este solubilă în apă și termostabilă, dar este sensibilă la acizi puternici și la baze. Toxina pătrunde în organism prin ingestie, injectare, inhalare și prin leziuni tegumentare. Simptomele apar la câteva minute după injectarea sau inhalarea toxinei și mai lent după ingestie (10–40 minute). Primul simptom este o senzație de amorțire a buzelor și limbii, între 20 minute și 3 ore după ingestia peștelui fugu. Urmează parestezia feței și extremităților, durerea de cap, durerea epigastrică, starea de rău general, diaree și vomă. Al doilea stadiu al intoxicației este accentuarea progresivă a paraliziei: incapacitatea de deplasare, dilatarea pupilei, tremor, pierderea coordonării motorii și a mușchilor fonatori, dificultăți respiratorii, convulsii, aritmia cardiacă. Victima, deși complet paralizată, poate fi conștientă și complet lucidă până cu puțin înainte de moarte. Moartea survine în 4–6 ore.

TTX se găsește în ovare, tegument, mușchi și ficatul de *Fugu rubripes*. Cantitatea de toxină într-un pește este suficientă să pentru a produce moartea a 30

de oameni. Doza letală pentru adult este de 1–2 mg. Diluată, toxina se foloseşte în clinică pentru atenuarea durerilor asociate cu nevralgiile sau cu artrita reumatoidă.

Kishi şi col. au sintetizat amestecul racemic al TTX în 1972.




Tetrodotoxina

### *Batrachotoxinele*

*Batrachotoxinele* sunt alcaloizi steroidici eliberaţi prin secreţiile incolore sau albe din glandele tegumentare localizate dorsal şi înapoia orificiilor auriculare ale broaştelor tropicale din genul *Phyllobates* (fig. 71). Se mai numesc şi broaşte „otrăvuri de săgeţi"* pentru că sunt folosite ca sursă de toxină pentru săgeţile utilizate de indienii sud-americani.

* Cea mai comună utilizare a acestei toxine este întâlnită la triburile de indieni din vestul Columbiei, pentru otrăvirea vârfurilor de săgeţi folosite la vânătoare.

La membrii familiei *Dendrobatidae (Dendrobates, Phyllobates)* s-au identificat peste 100 de toxine în secreţiile tegumentare. Circa 10 specii ale genului *Dendrobates* sunt cunoscute ca broaşte „otravă de săgeţi", dar numai genul *Phyllobates* secretă o batrachotoxină foarte puternică. Aceste amfibii trăiesc în regiunile calde ale Americii latine, unde umiditatea atinge 80%.

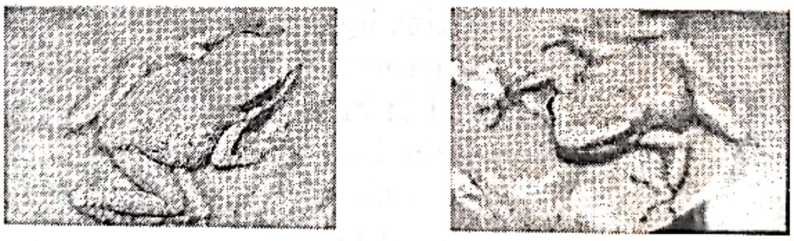


Fig. 71 – Phylobates terribilis.

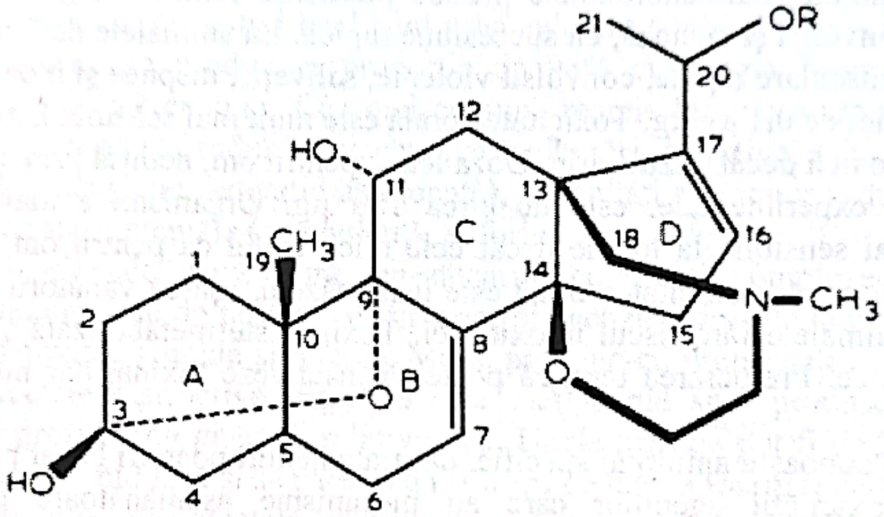
Structural, batrachotoxinele sunt unice datorită grupării hemiacetal între C3 şi C9, importantă pentru activitatea biologică. Funcţia hemiacetalică C4 – C9 se găseşte în alcaloizii din *Veratrum* (veratridină). Inelul heterociclic suprapus ciclurilor C/D al scheletului steroidic are un atom de N terţiar ce conferă proprietăţi bazice batrachotoxinei.

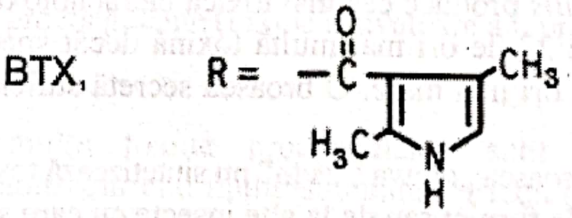
Toate batrachotoxinele sunt solubile în solvenţi organici şi astfel penetrează uşor membranele biologice.

Scanned with OKEN Scanner

Cele mai importante toxine ale grupului sunt *batrachotoxina* (fig. 72) şi *homobatrachotoxina*. Sunt printre cele mai puternice toxine neproteice naturale. Sunt stabile prin depozitare şi pot fi sintetizate chimic.

Când animalul este în pericol, toxina este eliberată reflex prin canalele glandulare. *Alcaloidul* a fost izolat în stare pură, s-a determinat structura şi s-au studiat proprietăţile chimice. Este mai puternică decât curara, o altă toxină folosită pentru săgeţi de către indienii sud-americani, derivată din plantele genurilor *Strychnos* şi *Curarea* şi de 10 ori mai puternică decât tetrodotoxina din peştele *Fugu*. Doza letală pentru om este estimată la 2–200 μg.




BTX-A, R = -H

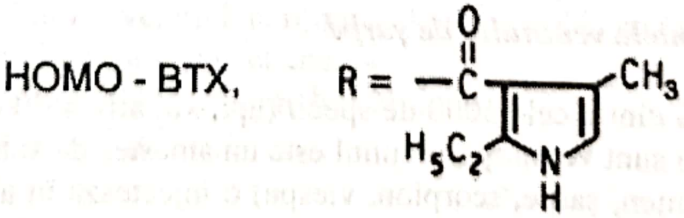



Fig. 72 – Batrachotoxina şi derivaţii săi naturali.

Batrachotoxina produce depolarizarea membranelor excitabile, în funcţie de concentraţie. Depolarizarea implică activarea selectivă a canalelor de $Na^+$. Batra-

chotoxinele se leagă de canalele de Na ale axonilor şi celulelor musculare şi inhibă închiderea lor. Neuronul se depolarizează complet şi transmiterea potenţialului de acţiune este blocată.

Depolarizarea produsă de batrachotoxină şi consecinţele depolarizării sunt blocate sau reversate în mediu cu o concentraţie mică de $Na^+$ sau de tetrodotoxină, ultima fiind un antagonist specific al canalelor de $Na^+$ activate.

Cele două toxine sunt cardiotoxice puternice, modifică permeabilitatea membranei pentru ioni, ceea ce duce la depolarizarea ireversibilă a nervilor şi muşchilor, aritmie, fibrilaţie, insuficienţă cardiacă.

La animale, batrachotoxinele produc pierderea echilibrului, alterarea stării generale, convulsii şi cianoză, cu succesiune rapidă. La animalele de laborator apar contracţii musculare rapide, convulsii violente, salivaţie, dispnee şi moarte, chiar la doze mai mici de 0,1 µg/kg. Toxicitatea orală este mult mai scăzută. Este de 10 000 de ori mai toxică decât gazul sarin. Doza letală pentru om, dedusă prin extrapolarea rezultatelor experimentale, este de circa 180 µg. Organismele mai mari sunt adeseori mai sensibile la toxine decât cele mici, astfel că pentru om doza letală poate fi mai mică. Toxicitatea orală este mai scăzută, aşa că vânătorii indieni pot consuma animalele fără riscul intoxicaţiei. Toxina este metabolizată şi derivatele nu sunt toxice. Prelucrarea termică poate să inactiveze toxina, dar nu toate sunt termolabile.

Nu se cunoaşte antidotul specific, dar tratamentul poate fi bazat pe principiul anihilării toxicităţii agenţilor care au mecanisme asemănătoare de acţiune: aconitina, veratridina, digitalina.

*Phyllobates terribilis* produce cea mai toxică batrachotoxină şi cea mai recent descoperită. Produce de 27 de ori mai multă toxină decât speciile înrudite, cu un potenţial toxic de 20 de ori mai mare. O broască secretă suficientă toxină pentru a omorî 50 de oameni.

Interesant este că broasca „otrava săgeţii" nu sintetizează toxina. Se presupune că broasca preia toxina de la furnici sau de la alte insecte cu care se hrăneşte. Insectele probabil preiau toxina de la o plantă. În decursul evoluţiei, modificările receptorilor broaştei au făcut-o insensibilă la efectele toxinei. Broaştele crescute în captivitate nu secretă toxină.

### *Componentele veninului de şarpe*

Circa 19% dintre cele 3000 de specii (aproximativ 450) din fauna herpetică a globului terestru sunt veninoşi. Veninul este un amestec de substanţe toxice pe care un animal (păianjen, şarpe, scorpion, viespe) o injectează în alt organism. Veninul este o adaptare evolutivă pentru imobilizarea prăzii şi secundar este folosit ca armă de apărare.

Veninurile sunt secreţii foarte toxice, produse în glande orale speciale, înrudite cu glandele salivare ale altor vertebrate. De aceea, veninul este considerat

Scanned with OKEN Scanner

ca o salivă modificată. Veninul are rol de imobilizare a prăzii şi prin conţinutul enzimatic foarte diversificat, începe chiar digestia ţesuturilor ei.

Fiecare specie de şarpe veninos produce un venin unic cu componente diferite şi cantităţi diferite de componente toxice şi netoxice.

În funcţie de caracteristicile morfologice – aranjamentul solzilor, dentiţie, osteologie, miologie, organe senzoriale, şerpii sunt împărţiţi în familii. Familiile de şerpi veninoşi sunt: *Atractaspididae, Elapidae, Hydrophidae şi Viperidae*.

Muşcătura de şarpe rămâne o problemă de sănătate publică în multe ţări. Incidenţa muşcăturii de către şerpii veninoşi poate depăşi cifra de 5 milioane/an. Starea toxică produsă de veninul de şarpe poartă denumirea generică de *ofitoxemie*.

Victimele care sfârşesc letal sunt preponderent copiii şi tinerii între 17 şi 27 ani. Muşcăturile se produc în proporţie de 98% cu ocazia încercărilor de a-i manevra sau de a-i captura. Cea mai comună reacţie la muşcătura de şarpe este spaima, care produce tulburări vegetative (tulburări digestive, tahicardie severă, frisoane, hipotensiune, salivaţie abundentă), dificultăţi respiratorii, durere, tremur, modificarea stării mentale (somnolenţă, euforie).

Veninurile de şarpe sunt amestecurile cele mai complexe dintre toate toxinele: un amestec de proteine enzimatice şi neenzimatice, de la 6 la 100 kD, de proteine netoxice, glucide şi metale. Multe proteine au proprietăţi enzimatice care produc efectele distructive. Efectele cele mai ample sunt produse de anumite peptide şi proteine cu gr. mol. relativ mică. Unele peptide pot fi de 25 de ori mai letale decât veninul brut şi se pare că au situsuri de legare foarte specifice.

În funcţie de efectele dominante, în veninul şerpilor s-au identificat următoarele 3 clase de toxine:

– *hemotoxine*: procoagulante (toxine activatoare ale protrombinei) şi hemolitice;
– *miotoxine;*
– *neurotoxine*.

Cele mai multe toxine procoagulante sunt enzime activatoare ale protrombinei, alcătuite din mai multe subunităţi. Efectul lor clinic este coagularea intravasculară diseminată.

Cantitatea şi compoziţia veninului variază cu specia, cu vârsta organismului, cu localizarea geografică a speciei şi chiar cu sezonul. Veninul este foarte stabil, fiind rezistent la schimbările de temperatură, la acţiunea medicamentelor.

S-au identificat peste 200 de enzime diferite, componente ale veninului. Din punct de vedere chimic, veninul conţine cel puţin 90% proteine din greutatea uscată şi cele mai multe proteine sunt enzime:

– fosfolipazele $A_2$, B, C, D (enzime hidrolitice);
– fosfataze (acide şi alcaline);
– proteaze;
– esteraze;
– acetilcolinesterază;
– transaminază;
– hialuronidază;

Scanned with OKEN Scanner

– fosfodiesterază;
– nucleotidază;
– L-aminoacidoxidaza;
– endonucleaza;
– ATP-ază;
– DN-ază şi RN-ază etc.

Un număr de 10 enzime se regăsesc în veninurile celor mai mulţi şerpi: enzimele proteolitice, fosfolipazele şi hialuronidazele sunt cele mai comune.

*Enzimele proteolitice* catalizează degradarea proteinelor tisulare ale prăzii, produc liza celulelor şi a ţesutului conjunctiv la locul muşcăturii şi determină senzaţia de durere şi formarea edemului.

*Fosfolipazele* sunt enzime prezente în secreţia tuturor şerpilor veninoşi.

*Fosfolipaza $A_2$*

*Fosfolipaza* $A_2$ face parte din grupul componentelor miotoxice, denumite *miotoxine*. Denumirea semnifică efectul citotoxic direct asupra celulelor musculare scheletice. Toxicitatea fosfolipazelor variază de la cea medie, până la efectele foarte distructive pentru muşchi şi nervi. Veninul unor şerpi de mare, al elapidelor terestre şi al unor specii de *Viperidae* produce fenomene miotoxice nu numai la situsul injecţiei veninului, dar şi miotoxicitate sistemică, caracterizată prin leziuni musculare extinse, creşterea accentuată a creatin-kinazei plasmatice, mioglobinurie, adeseori asociată cu alterări renale şi hiperkalemie.

Multe veninuri de *Viperidae* produc predominant, efecte miotoxice locale, caracterizate prin mionecroză la locul injectării veninului, dar fără manifestări miotoxice sistemice. Mionecroza locală este adeseori asociată cu alte efecte: efectul vezicant, hemoragie şi edem.

Miotoxinele pot fi *molecule mici* ce acţionează asupra canalelor de $Na^+$: *miotoxina* **a**, *crotamina, cardiotoxinele* din veninul elapidelor şi *melitina* din veninul de viespe. Toate sunt active asupra membranei citoplasmatice şi alterează fluxul ionic.

Metaloproteazele hemoragice din veninul de şarpe produc mionecroza, dar mecanismul pare a fi indirect, indus de ischemie.

Cele mai importante enzime ale veninului de animale, din punct de vedere cantitativ şi funcţional, care produc leziuni musculare sunt *fosfolipazele $A_2$*.

Fosfolipazele $A_2$ din veninul şerpilor aparţin clasei I (elapide terestre şi şerpi de mare), clasei a II-a (din veninul viperidelor) şi clasei a III-a (din veninul de viespe).

Fosfolipazele $A_2$ sunt cele mai studiate datorită rolului important în variate activităţi biologice: în fertilizare, în proliferarea celulară, în contracţia muşchilor netezi, în stările de hipersensibilitate, în maladia cronică inflamatorie. Fosfolipaza $A_2$ eliberează acidul arachidonic din fosfolipidele membranare ale mastocitului

Scanned with OKEN Scanner

activat, din care se sintetizează prostaglandine şi leucotriene, molecule mediatoare ale reacţiei de hipersensibilitate imediată.

Fosfolipazele $A_2$ au rol în menţinerea homeostaziei membranei, inclusiv menţinerea rezervei de fosfolipide celulare şi în turnover-ul lor prin reacţia de deacilare/reacilare.

Enzimele mamaliene sunt netoxice şi nu induc efecte farmacologice puternice.

Fosfolipazele $A_2$ din venin sunt asemănătoare ca structură şi funcţie catalitică, cu enzimele mamiferelor, dar spre deosebire de acestea, pe lângă rolul posibil în digestia prăzii, fosfolipazele din venin sunt toxice şi induc un spectru larg de efecte farmacologice, interferând cu procesele fiziologice. Acest grup de proteine mici a fost studiat din punct de vedere biochimic, molecular, toxicologic, farmacologic şi fiziologic. S-a presupus că proprietatea unică de a se lega de un organ specific sau de un ţesut, se datorează afinităţii înalte de legare de proteinele specifice, care acţionează ca receptori (acceptori).

Specificitatea de legare a fosfolipazelor $A_2$ este conferită de prezenţa situsului farmacologic pe suprafaţa sa, care este independent de situsul catalitic şi care probabil este complementar ca sarcină electrică faţă de situsul de legare pe suprafaţa proteinei acceptoare. După legarea de molecula ţintă, fosfolipaza $A_2$ induce efectele farmacologice prin mecanisme dependente sau independente de activitatea catalitică.

Fosfolipazele $A_2$ sunt enzime hidrolitice unice, prin aceea că sunt foarte solubile în apă, dar hidrolizează substratul fosfolipidic insolubil în apă, în fază monomeră, micelară sau sub forma dublului strat. Activitatea catalitică creşte de până la 10 000 de ori, după ce fosfolipidele monomere se agregă în micelii la concentraţia micelară critică.

Fosfolipazele $A_2$ catalizează hidroliza legăturii *acil sn-2* a glicerofosfolipidelor* într-o reacţie dependentă de $Ca^{2+}$, rezultând acizi *graşi liberi* şi *lizofosfolipide*. Enzimele sunt ubicvitare în natură, cu localizare intracelulară sau extracelulară şi hidrolizează fosfolipide variate. În cele mai multe cazuri, fosfolipazele $A_2$ produc ele însele efecte farmacologice fără să necesite prezenţa altor componente. Alteori însă, sunt dependente de alţi factori proteici pentru medierea efectelor specifice.

* sn = număr stereochimic (stereochemical numbering).

Fiecare fosfolipază $A_2$ produce un efect specific. De exemplu, fosfolipaza $A_2$ din β-bungarotoxină blochează transmiterea potenţialului de acţiune la nivel presinaptic, în sinapsele colinergice, dar nu este activă asupra sinapselor adrenergice sau a celor care au mediatorul glutamat, chiar la concentraţii mari. Nu are activitate postsinaptică, miotoxică sau anticoagulantă. Efectele farmacologice foarte specifice se explică prin afinitatea înaltă între situsul farmacologic al enzimelor şi substratul pe care se leagă.

Deşi fosfolipidele reprezintă substratul specific, situsurile pentru legarea fosfolipazelor $A_2$ pot fi *lipidele membranare* şi *glicoproteinele*. Prezenţa ubicvitară a fosfolipidelor, sensibilitatea diferenţiată a diferitelor specii la fosfolipazele $A_2$

Scanned with OKEN Scanner

sunt argumente împotriva fosfolipidelor membranare ca situsuri ţintă exclusive pentru fosfolipazele $A_2$. De aceea, se consideră că proteinele (sau glicoproteinele) pot funcţiona ca situsuri ţintă de legare a fosfolipazelor $A_2$. După legare, enzimele pot să exercite efecte farmacologice dependent sau independent de activitatea enzimatică.

În mecanismele dependente de activitatea enzimatică, efectul farmacologic este mediat de produsele rezultate din hidroliză: lizofosfolipide şi acizi graşi.

În mecanismele independente de activitatea enzimatică, legarea de proteinele ţintă poate produce efecte farmacologice, acţionând ca agonist sau antagonist, prin interferenţa cu ligandul fiziologic al proteinei ţintă, urmată de hidroliza fosfolipidelor din imediata proximitate.

S-a studiat secvenţa de aminoacizi a peste 280 de fosfolipaze $A_2$. Ele au proprietăţi farmacologice diferite, dar au identitate a 40–99% din totalul aminoacizilor. Configuraţia tridimensională este asemănătoare. Diferenţele funcţionale majore nu se corelează cu diferenţe de ordin structural.

Veninul de şarpe adeseori conţine un număr mare de izoenzime ale fosfolipazei $A_2$. De exemplu, *Naja naja, Vipera russelli* conţin mai mult de 10 izoenzime, care pot produce efecte farmacologice diferite.

Fosfolipazele au două acţiuni separate şi distincte:

– activitate esterazică neletală;
– activitate toxică neurologică, prin blocarea pre- sau postsinaptică a transmiterii impulsului la nivelul joncţiunii neuromusculare.

Studiile histologice şi electrono-optice cu privire la efectul fosfolipazei $A_2$ asupra muşchiului scheletic, relevă ruperea membranei plasmatice, contracţia miofilamentelor, umflarea mitocondriilor şi ruperea membranei lor, dezorganizarea sistemelor membranare intracelulare (reticulul sarcoplasmic şi tubulii T), picnoza nucleului. Evenimentele degenerative sunt urmate de reacţia inflamatorie acută, asociată cu durere, edem, afluxul masiv de PMN şi macrofage. De remarcat este că nu sunt alterate celulele satelite miogene.

În final, are loc procesul regenerativ al celulelor musculare, prin activarea celulelor satelite miogene care devin mioblaste. Mioblastele fuzionează şi formează miotuburi în spaţiul delimitat de membrana bazală a celulei musculare necrotice.

*Hialuronidaza* dizolvă materialul intercelular şi substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv, favorizând răspândirea veninului în ţesuturile prăzii.

*RN-azele, DN-azele, nucleotidazele, aminoacid-oxidazele, lactat-dehidrogenazele, fosfatazele acide şi bazice* perturbă funcţiile celulare, producând colapsul metabolic, starea de şoc şi moartea. *Colagenazele* din veninul de viperă degradează colagenul.

*Hemoraginele* produc hemoragii lângă şi la distanţă de muşcătură. Unele componente ale veninului (enzimele asemănătoare trombinei) previn coagularea sângelui. Altele au efect coagulant în tot sistemul circulator. *Hemolizinele* lizează hematiile, iar *citolizinele* produc liza leucocitelor circulate.

Scanned with OKEN Scanner

*Componente neenzimatice ale veninului*

Nu toate componentele chimice ale veninului de şarpe sunt enzime: unele sunt toxine peptidice sau glicoproteine. Glicoproteinele suprimă răspunsul imun al ţesuturilor prin reacţii anticomplementare şi se găsesc în veninul unor vipere. Cea mai selectivă şi amplă depleţie a lui C3 este produsă de veninul de cobră (*Naja naja*). Componenta activă a veninului de cobră (o proteină de 140 kD) este omologă, din punct de vedere funcţional cu C3b, dar este diferită structural de acesta şi este rezistentă la activităţile inhibitorii care se exercită în mod normal asupra lui C3b. Deoarece funcţionează ca C3b, factorul din veninul de cobră (CoF) interacţionează cu factorul B şi activează calea alternă. Se formează un complex stabil, *PCoFBb*, cu funcţie de convertază a lui C3. C3b eliberat formează o cantitate mare de PC3bBb, alimentând bucla de amplificare a convertazei C3. Astfel, C3 este eliminat eficient pentru 4–96 de ore.

Aminele biogene (catecolamine, histamină, serotonină, spermină) perturbă transmiterea impulsurilor nervoase şi alte tipuri de semnalizare intercelulară. Sunt inductoare ale modificărilor condiţiilor de circulaţie locală. Acetilcolina perturbă transmiterea normală a impulsului nervos, producând insuficienţa cardiacă şi respiratorie. Rolul unor componente ale veninului nu se cunoaşte: sunt compuşi organici netoxici şi ioni anorganici. În compoziţia veninului unor şerpi se găsesc *glucide* (neutre, aminoglucide, acid sialic), *lipide* (colesterol, mono-, di-, trigliceride, fosfolipide).

Ionii anorganici activează şi inactivează enzimele. Unii se găsesc în concentraţie mare, adică sunt macroelemente (Ca, Cl, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, K, Na, $SO_4^{2-}$, Z), iar alţii sunt microelemente: Bi, A, Mo, Pa, Pl, Se, Ag.

Veninul fiecărui şarpe conţine mai mult decât o toxină. În asociaţie, toxinele au un efect mult mai puternic decât suma efectelor individuale.

Componentele neenzimatice ale veninului diferitelor specii au un spectru relativ larg de activităţi şi pe baza efectelor dominante asupra organismului uman, speciile veninoase s-au clasificat ca *neurotoxice* (au acţiune asupra sistemului nervos), *hemotoxice* (au acţiune asupra sistemului circulator) şi *miotoxice* (cu acţiune asupra ţesutului muscular). *Cardiotoxinele* depolarizează muşchiul cardiac şi alterează contracţia inimii, producând insuficienţa cardiacă. Mecanismul fundamental al patofiziologiei morbidităţii şi mortalităţii este stoparea funcţiilor celulare sub acţiunea enzimelor şi toxinelor.

În general, veninurile sunt descrise ca *neurotoxine* şi respectiv *hemotoxine*, dar multe conţin ambele tipuri de componente.

Variaţia compoziţiei veninului explică diversitatea clinică a ofitoxemiei. Sunt variaţii mari ale proprietăţilor diferitelor componente în interiorul aceleiaşi specii în diferite arealuri geografice, dar şi de la un sezon la altul şi în funcţie de vârstă.

Scanned with OKEN Scanner

*Mecanismul de acţiune al neurotoxinelor*

Neurotoxinele din venin blochează transmiterea sinaptică. Unele inhibă eliberarea mediatorului sinaptic prin exocitoza veziculei sinaptice la situsul *presinaptic*, iar altele se leagă de receptorul pentru mediator la situsul *postsinaptic*. Sinapsa neuromotoare este colinergică.

Acetilcolina se sintetizează în citosolul axonului terminal şi este înglobată în vezicula sinaptică. Eliberarea acesteia este declanşată de potenţialul de acţiune. Depolarizarea membranei presinaptice determină deschiderea canalelor de Ca dependente de sarcina electrică. Concentraţia extracelulară a Ca este superioară celei intracelulare, astfel că ionii de Ca inundă terminaţia nervoasă în timp ce canalele sunt deschise. Creşterea concentraţiei intracelulare a ionului de Ca este semnalul care produce eliberarea mediatorului din veziculele sinaptice. Veziculele îşi eliberează conţinutul prin procesul de exocitoză. Membrana veziculei sinaptice fuzionează cu membrana presinaptică, permiţând mediatorului să treacă în fanta sinaptică.

Acetilcolina eliberată în fanta sinaptică se leagă de proteinele receptoare specifice la nivelul plăcii motorii. Legarea mediatorului determină schimbarea conformaţiei proteinei receptor. Proteinele receptor formează canale ionice de sodiu care traversează membrana, alcătuite din 5 subunităţi ce delimitează un canal central (por).

În absenţa mediatorului, canalul este închis. După legarea mediatorului la un situs specific al regiunii extracelulare a canalului, canalul se deschide datorită modificărilor conformaţionale. Creşterea concentraţiei interne a ionului de Na depolarizează membrana celulei musculare şi eventual produce contracţia.

În esenţă, când impulsul nervos ajunge la situsul presinaptic al joncţiunii neuro-musculare, Ca pătrunde în terminaţia axonică şi declanşează eliberarea acetilcolinei. Aceasta traversează fanta sinaptică şi se leagă specific de receptorul pentru acetilcolină al membranei postsinaptice. Se produce depolarizarea fibrei musculare. Orice substanţă care interferă cu procesele normale ale transmiterii sinaptice poate fi neurotoxică.

În funcţie de situsul acţiunii, se disting două tipuri de neurotoxine: bungarotoxina şi crotoxina. *Bungarus multicinctus* produce două variante de bungarotoxine:

– α-bungarotoxina, cu acţiune la situsul *postsinaptic*. Se leagă ireversibil de receptorul nicotin-acetilcolină (Ach) pe membrana postsinaptică şi blochează transmiterea potenţialului de acţiune prin nedepolarizarea membranei postsinaptice. S-a folosit pentru marcarea receptorului de Ach, deoarece se leagă specific de receptorul nicotin-Ach.

– β-bungarotoxina este activă la situsul *presinaptic*. După o facilitare iniţială a eliberării mediatorului sinaptic, toxina blochează eliberarea veziculelor

Scanned with OKEN Scanner

sinaptice în care este depozitată Ach, prin activitatea fosfolipazică $A_2$ a toxinei şi transmiterea sinaptică este blocată. Nu are activitate presinaptică. La periferie, β-bungarotoxina acţionează în special la nivelul joncţiunii neuromusculare şi blochează transmiterea impulsului contractil. Ca şi toxina botulinică, nu inhibă acetilarea colinei.

Veninul de *Bungarus* are proprietăţile toxice ale curarei.

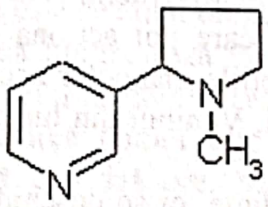
Bungarotoxina se foloseşte pentru marcarea şi pentru izolarea receptorului pentru nicotin-Ach prin metoda cromatografiei de afinitate.

*Crotoxina* (produsă de *Crotalus*), ca şi β-bungarotoxina are activitate fosfolipazică $A_2$ şi blochează eliberarea veziculelor sinaptice la situsul presinaptic, dar mecanismul de acţiune este diferit de al β-bungarotoxinei. Toxina este formată dintr-o subunitate B cu acţiune fosfolipazică $A_2$ şi activitate toxică slabă şi o subunitate A neenzimatică.

În funcţie de acţiunea farmacologică a diferiţilor agonişti şi antagonişti s-au distins două tipuri de receptori colinergici: *muscarinici* şi *nicotinici*. Receptorii s-au distins pe baza acţiunii selective a agoniştilor muscarinici şi respectiv nicotinici.

*Agoniştii* (substanţe care se leagă de acelaşi receptor şi produc aceleaşi efecte) – Ach, carbamil-colina şi nicotina produc acelaşi tip de răspuns fiziologic: activarea sinapselor colinergice.

Receptorii de Ach sunt nicotinici şi se găsesc într-o varietate de ţesuturi: sistemul nervos vegetativ, joncţiunea neuromusculară, în encefalul vertebratelor, în organele electrice ale peştilor.

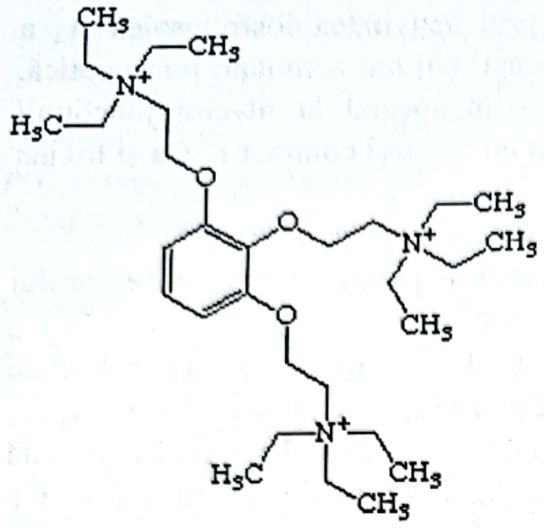



S-Nicotina

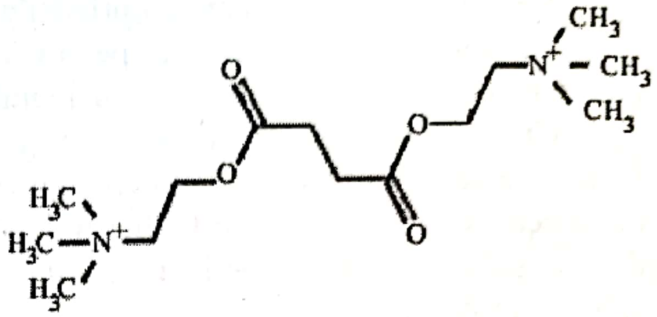
Răspunsul receptorilor nicotinici este rapid, de scurtă durată şi excitator. Receptorii nicotinici se găsesc în sistemul nervos vegetativ, la nivelul joncţiunii neuromusculare şi în creierul vertebratelor. Încărcătura nicotinică datorată fumatului în timpul sarcinii, este cauza naşterii premature şi a subdezvoltării fătului. Fumatul este asociat cu alterări ale funcţiei pulmonare la naştere. Nicotina poate altera dezvoltarea plămânului, traversând placenta pentru a interacţiona direct cu receptorii pentru Ach pe celulele ne-neuronale ale plămânului fătului.

*Antagoniştii* receptorului nicotinic sunt curara, α-bungarotoxina, galamina şi succinil-colina. Ultimii 2 compuşi se folosesc în chirurgie pentru blocarea joncţiunilor neuromusculare.

Scanned with OKEN Scanner



Galamina



Succinilcolina

*Dintele veninos*

Dintele veninos este un dinte modificat pentru a inocula veninul la locul muşcăturii, funcţionând ca o seringă hipodermică. Veninul este produs de o pereche de glande veninoase mari. Cele două glande sunt localizate pe fiecare latură a capului, sub şi în spatele ochilor. Veninul este produs de 4–5 lobi de celule secretorii. Celulele secretoare pot să reprezinte până la 80% din conţinutul celular total al glandei. Secreţia se drenează prin tubulii mici ai lobilor glandulari, într-un spaţiu gol, denumit *lumenul glandei*. Lumenul se continuă cu ductul, prin care veninul este purtat spre baza dintelui. Ductul este înconjurat de mase mici de ţesut glandular – glande accesorii – care pot acţiona ca valve reglatoare ale curgerii veninului spre dinte. Deşi secreţiile glandelor accesorii nu sunt toxice, pot activa unele componente ale veninului. Veninul din lumenul glandei este mai puţin toxic decât veninul din dinte.

Ductul nu se extinde în dinte, ci se deschide adiacent, într-o teacă de ţesut conjunctiv de la baza dintelui. Teaca reprezintă un mecanism de închidere în jurul dintelui, orientând curgerea veninului în canalul acestuia. Dintele are o bază largă, se îngustează spre vârf şi totdeauna este curbat.

*Ofitoxemia*

Efectele clinice ale veninului asupra gazei depind de compoziţia acestuia şi de volumul injectat prin muşcătură. Uneori muşcătura este superficială şi simptomele sunt minime sau muşcătura este chiar asimptomatică (muşcătura uscată), iar alteori manifestările sunt sistemice sau chiar mortale.

*Manifestările locale* apar în 6–8 minute, sau la circa 30 de minute. Durerea locală cu tendinţă de iradiere şi apariţia unui halou roşietic sunt manifestări imediate. În cele mai multe cazuri, în jurul ariei lezate se produce *edemul*, în

Scanned with OKEN Scanner

5 minute după muşcătură şi uneori progresează rapid, implicând întreaga extremitate lezată, într-o oră. De cele mai multe ori, edemul progresează lent în 8–36 ore. Hialuronidaza fluidizează substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv şi favorizează diseminarea tisulară a veninului. Componentele veninului măresc permeabilitatea capilarelor, care poate produce trecerea componentelor sângelui în spaţiul extravascular. Veninul are acţiune citolitică directă şi produce necroza locală şi infecţia secundară.

Veninul poate avea acţiune neurotoxică directă, ducând la paralizie şi insuficienţă respiratorie, efect cardiotoxic, miotoxic şi nefrotoxic.

Alt simptom clinic major este durerea, însoţită de adenopatie regională.

*Manifestările generalizate* sunt rapide (apar în 5 minute) pentru veninul de cobră sau lente (apar la 10 ore) pentru alţi şerpi. Împărţirea în veninuri neurotoxice (de cobră), hemoragice (vipere) şi miotoxice (şerpi de mare) are numai o valoare orientativă, pentru că manifestările unui venin sunt mixte.

Efectele *hemoragice* se datorează în special unui *inhibitor al agregării plachetelor*. Agregarea plachetară are rol vital în menţinerea integrităţii peretelui vascular, uşurând activarea factorilor coagulanţi şi retracţia cheagului. Modificarea activităţii plachetelor poate produce infarctul miocardic şi atacul cerebral, situaţii în care cheaguri mici formate în lumenul vascular limitează aprovizionarea cu sânge a muşchiului cardiac şi a creierului. Unele proteine ale veninului interferă cu tromboza şi hemostaza, modificând agregarea plachetelor şi/sau coagularea sângelui.

Manifestările *neurotoxice* sunt rezultatul blocajului neuromuscular, care produce paralizia flască a muşchilor. Veninul de cobră este de 15–40 de ori mai puternic decât tubocurarina. Ptoza este cea mai timpurie manifestare neuroparalitică, urmată de oftalmoplegie. Paralizia progresează la muşchii palatului, maxilarelor, limbii, laringelui, gâtului, deglutiţiei. Muşchii inervaţi de nervii cranieni suferă mai timpuriu efectul paraliziei. Instalarea comei este variabilă: unele cazuri, după muşcătura cobrei, intră în comă în două ore. Modificările cardiotoxice includ tahicardia, hipotensiunea, modificarea EG. Necroza muşchiului striat la locul muşcăturii produce mioglobinurie.

Veninul de şarpe produce modificări hemostatice prin mecanisme diferite:

– activarea coagulării intravasculare;
– modificarea activităţii plachetelor;
– hemoliza;
– sângerare din situsuri multiple.

Severitatea efectelor toxice este influenţată de vârstă, starea de sănătate, masa corporală.

*Terapia* specifică faţă de toxinele veninului se face cu serul antivenin, obţinut prin imunizarea calului cu venin recoltat de la şerpi. Serurile pot fi *monovalente* (au specificitate de componentele veninului unei specii) sau sunt *polivalente* (conţin anticorpi faţă de componentele din veninul câtorva specii). Serurile monovalente

Scanned with OKEN Scanner

sunt ideale, dar sunt costisitoare şi greu de obţinut, datorită dificultăţilor de identificare a speciei care a produs muşcătura.

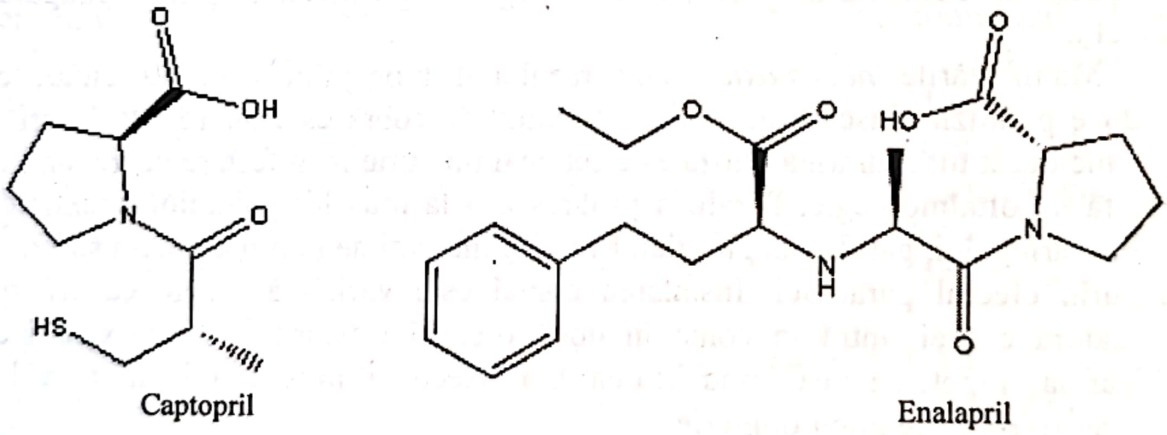
Serul antivenin se administrează numai dacă manifestările toxice sunt evidente: neurotoxicitate, hipotensiune, insuficienţă renală acută, modificări EKG.

*Utilizări farmacologice ale veninului de şarpe*

Veninurile au un mare potenţial pentru utilizare *farmacolgică*, datorită varietăţii mari de compuşi pe care-i conţin şi acţiunii specifice a fiecărui compus.

Medicamentele *β-blocante*, larg folosite în tratamentul bolilor cardiovasculare, s-au descoperit în compoziţia veninului *Bothrops*.

Cel mai bun exemplu al obţinerii unui medicament din veninul de şarpe este acela al inhibitorilor enzimei care converteşte precursorul în angiotensină. Aceste veninuri conţin un peptid cu acţiune enzimatică, al cărui efect este stoparea activităţii enzimei implicată în producerea hipertensiunii arteriale. Enzima converteşte un precursor inactiv, în hormonul angiotensină, care determină contracţia vaselor de sânge şi creşterea presiunii sanguine. O dată cu blocarea farmacologică a activităţii enzimei, presiunea sanguină poate să scadă şi agenţii cu această activitate se folosesc în tratamentul hipertensiunii arteriale. Inhibitorii ACE (angiotensin-converting enzyme) sunt cei mai comercializaţi pe piaţa farmacologică (fig. 73).




Captopril Enalapril

Fig. 73 – Inhbitorii enzimei care converteşte angiotensina (ACE).

Un alt exemplu de medicament obţinut din veninul de şarpe îl reprezintă *inhibitorii agregării plachetare şi coagulării sanguine*. Agregarea plachetară are un rol vital în hemostază, prin menţinerea integrităţii peretelui vascular, favorizarea activării factorilor coagulanţi şi retracţia cheagului. Unele proteine ale veninului interferă cu tromboza şi cu hemostaza, modificând agregarea plachetelor şi/sau coagularea sanguină. Modificarea funcţiei plachetare poate produce infarctul miocardic şi atacul cerebral, situaţii în care cheaguri mici formate în lumenul vaselor de sânge limitează aprovizionarea cu sânge a muşchiului cardiac şi a creierului. Din veninul unei vipere se extrage un anticoagulant eficient.

Scanned with OKEN Scanner

Multe veninuri de şarpe conţin componente cu activitate anti- sau procoagulantă. Aceste efecte sunt datorate, în general, acţiunii unor enzime cu gr. mol. mare, dar au fost identificate molecule mici cu efecte asemănătoare: peptide de 500–900 Da, ce inhibă agregarea plachetelor. Ele acţionează ca antagonişti ai unui receptor glicoproteic al membranei plachetare, care favorizează interacţiunea plachetelor cu fibrinogenul. După caracterizarea detaliată a peptidului din veninul de şarpe, prin metoda RMN, specialiştii companiei Genentech au sintetizat o moleculă peptidică mică ce imită molecula naturală şi care poate fi folosită ca medicament pentru controlul coagulabilităţii crescute.

Două *analgezice* derivă din veninul de cobră: *cobroxin* – se foloseşte ca înlocuitor al morfinei, pentru blocarea transmiterii nervoase, iar *nyloxin* reduce durerea artritică severă.

Componentele veninului sunt folosite în *cercetarea fiziologică, biochimică şi imunologică*. Întârziind sau grăbind procesele biochimice celulare, ca de exemplu, transferul impulsului nervos şi coagularea sângelui, componentele veninului permit examinarea procesului şi găsirea medicamentelor care să corecteze disfuncţiile. Veninul unor şerpi este cercetat pentru potenţialul său antiviral (hepatite), antibacterian (tetanos, trachoma, febra scarlatinoasă, botulism) antimalaric şi anticarcinogenic.

Alte maladii pentru care veninurile s-au folosit în cercetare includ: boli nervoase (epilepsie, scleroza multiplă, maladia Parkinson, poliomielită), boli musculo-scheletice (*myasthenia gravis*, artrita reumatoidă), boli cardiovasculare (hipotensiune, hipertensiune, angina cardiacă, aritmia), maladii oculare (conjunctivită, cataractă).

Scanned with OKEN Scanner

# BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

## Reviste şi periodice:


Applied Microbiology
Applied and Environmental Microbiology
Archives of Microbiology
Journal of Biol. Chem.
Can. J. of Microbiology
Clinical Microbiological Reviews
Journal of Bacteriology
Journal of Gen. Microbiology
Journal of Clinical Microbiology
Microbiological Reviews
Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR)
Nature
Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Science
Scientific American etc.
Arch. Toxicology
New England J. Med.
J. Pharmac. Biomed. Anal.
J. Biol. Pharmacol
J. Pharm. Sci
FEBS Letters
Experientia
J. Amer. Med. Assoc.
Anal. Biochem
Mycologia
Annual Review of Phytopatology
Phytochemistry
Arch. Pathol. Lab. Med.
Br. Med. J
Toxicon


## Cărţi:


***Bodea C.***, 1965, Tratat de Biochimie vegetală – Edit. Acad. RSR.

***Hudler, G.,*** 1998, Magical and Mischievous Molds. Princeton University Press, 248 pp.

***Hunter, B.T.***, 1989, Mycotoxins: A Significant Public Health Problem. Consumer's Research 72 (6): 8–9.

***Kendrick, B.,*** 1992, Mycotoxins in Food and Feed in the Fifth Kingdom, 2nd ed. pp. 316–331. Mycologue Publications. Waterloo Ontario.


Scanned with OKEN Scanner

**Matossian M.K.**, 1989, Poisons of the Past: Molds, Epidemics and History. Yale University Press, New Haven.

***Cliver D.O.***, 1990, Foodborne diseases. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

***Cuatrecasas P.***, 1977, The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins – Series B, Vol. 1, Chapman and Hall, London.

***Fioramonti J., Dupuy C., Dupuy J., Bueno L.***, 1993, The mycotoxin, deoxynivalenol, delays gastric emptying. through serotonin-3 receptors in rodents – J. Pharmacol Exp Ther. Sep; 266(3): 1255–1260.

***Kuiper-Goodman T.***, 1991, Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. Vet. Hum. Toxicol, 33, 325–333.

***Nenițescu C. D.***, 1981, Chimie organică, Edit. Acad. RSR.

***Kuiper-Goodman T., P.M.S. Krogh P.***, 1987, Mycotoxins in Food. Academic Press Limited, London.

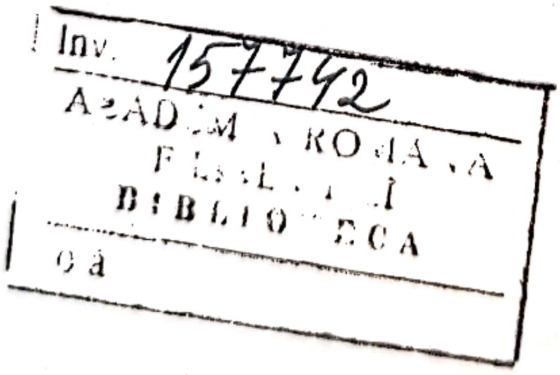
***Patockaa J., L. Stredab,*** 2002, Brief Review of Natural Nonprotein Neurotoxins – The ASA Newleter.

***Riemann H., F.L. Bryan***, 1979, Food-borne infections and intoxications.University of California, Davis, California.

***Rodricks J. V., Hesseltine C. W., Mehlman M. A.***, 1977, Mycotoxins in human and animal health – Pathotox Publishers.

***Scott P.M.***, 1997, Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone and aflatoxin B1. Food Additives and contaminants, 14, 333–339.

***Trucksess M.W., A.E. Pohland***, 2001, Mycotoxin protocols, Humana Press, Totowa, New Yersey.


Inv. 157742
ACADEMIA ROMÂNĂ
BIBLIOTECA

ISBN 973-27-1136-1
9 789732 711361

Scanned with OKEN Scanner